

FELIPE AUGUSTO MARQUEÑO MAURUTTO

**CONTRIBUIÇÃO À CITOGENÉTICA DE PEIXES DO GÊNERO *Hypostomus*  
LACÉPÈDE (1803) (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)**

CURITIBA

2010

FELIPE AUGUSTO MARQUEÑO MAURUTTO

CONTRIBUIÇÃO À CITOGENÉTICA DE PEIXES DO GÊNERO *Hypostomus*

LACÉPÈDE (1803) (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Genética)

CURITIBA

2010



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FELIPE AUGUSTO MARQUEÑO MAURUTTO** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito “B”.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni - Orientador - UFPR  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Profª Drª Mara Cristina de Almeida - UEPG  
Membro Titular

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari - UFPR  
Membro Titular

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética

Orientador

Prof. Dr. ROBERTO FERREIRA ARTONI

Co-orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARTA MARGARETE CESTARI

Dedico esta dissertação à maior provação, e maior  
dádiva de minha vida, Luiz Felipe Guandalini  
Maurutto, meu filho.

## Agradecimentos

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e compreensão, aos meus irmãos pelo apoio incondicional, aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, GUGA, SCHUH, MOSCA, FUCÃO, MILICO, BERNA, MÔ, DANILO, PAULO, HENRIQUE RODOLFO, JAPA, GUTO, TIGRÃO, BUSÃO, MARCELINHO, BALEN, KABELO, TUNCIA, BABI, WANE, TAYNAH, GY, GABY entre outros... E em especial à THÁÍS pelo amor, ajuda e apoio...

Aos meus avós que embora já ausentes, continuam presentes sempre no meu pensamento...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, pela compreensão, além de todo conhecimento que em poucas conversas pude adquirir...

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Margarete, por ter me iniciado e contribuído muito para minha carreira científica...

Aos membros da banca Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Cristina de Almeida, pela disponibilidade, interesse e crescente amizade...

Aos professores e funcionários do departamento, que nem sempre me ensinaram o que gostariam, mas sempre acrescentaram algo em minha vida...

Aos meus sobrinhos Lucas e Isabeli, e meu filho Luiz Felipe por tornarem a vida muito, mas muito mais divertida...

## Resumo

O gênero *Hypostomus* é amplamente distribuído pela América do Sul e um dos mais estudados dentre os Loricariidae, com cerca de 130 espécies descritas. Entretanto, sua correta identificação taxonômica é bastante difícil devido às discretas diferenças morfológicas entre as espécies. Uma mesma entidade taxonômica, em diferentes localidades, apresenta características cariotípicas distintas. Deste modo, dados citogenéticos acerca deste gênero são fundamentais para elucidar a história evolutiva do grupo. Análises citogenéticas foram realizadas em cinco espécies de *Hypostomus*: duas da região de Sapopema - PR (*Hypostomus regani* e *Hypostomus albopunctatus*), uma da região de Ponta Grossa - PR (*Hypostomus* aff. *ancistroides*), uma da região de Curitiba - PR (*Hypostomus derbyi*) e outra da região de Manguinhos - PR (*Hypostomus commersonii*). Os padrões citogenéticos encontrados apresentam diferenças em relação à evolução cariotípica proposta para o grupo. Foi evidenciado um sistema de determinação sexual do tipo ZZ/ZW para *H. albopunctatus*. Não houve correlação entre o número diplóide e a quantidade de heterocromatina. Foi também observada uma dinâmica dos sítios organizadores do nucléolo em relação aos cromossomos do complemento cariotípico, evidenciada tanto pela atividade detectada pela prata coloidal (Ag-RONs), assim como pela localização gênica com sondas DNAr 18S por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Os dados obtidos reforçam o aproveitamento de marcadores citotaxonômicos para identificar e classificar espécies do gênero *Hypostomus* e corroboram os dados de diversidade cariotípica anteriormente relatados para este gênero de peixes neotropicais.

## Abstract

The genus *Hypostomus* is widely distributed in the South America and it is one of the most studied among Loricariidae, with almost 130 species described. However, the correct taxonomic identification is complicated, due to discrete morphological differences between the species. The same taxonomic entities, in different locations, have distinct karyotypic characteristics. Thus, cytogenetic data are fundamental to elucidate the evolutive history of this group. Cytogenetic analyzes were performed in five species of *Hypostomus*: Two from the region of Sapopema, PR (*Hypostomus regani* e *Hypostomus albopunctatus*), one from Ponta Grossa - PR (*Hypostomus* aff. *ancistroides*), one from Curitiba (*Hypostomus derbyi*) and another from Manguinhos – PR (*Hypostomus commersonii*). The cytogenetic patterns found, show some differences related to the karyotypic evolution proposed for the group. Was identified a ZZ/ZW sex-determination system in *H. albopunctatus*. Were not found any relation between the diploid number and the heterochromatin amount. Was also observed a dynamic of the sites of nucleolus organizer related to the chromosomes of the karyotypic complement, detected even by the impregnation of Silver nitrate (Ag-NORs), as by the gene localization with 18S probes by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Obtained data reinforce the advantages of cytotaxonomic markers to identify and classify species of the genus *Hypostomus* and corroborate data about karyotypic diversity already related for this genus of neotropical fishes.



## Lista de Figuras

Figura 01. Relações Filogenéticas entre as subfamílias de Loricariidae.....	05
Figura 02. Dados citogenéticos referentes à família Loricariidae .....	07
Figura 03. Municípios onde foram realizadas as coletas dos espécimes .....	13

### Capítulo I

Figura 04. Mapa do município de Sapopema.....	28
Figura 05. Metáfases mitóticas de <i>Hypostomus albopunctatus</i> do Rio Laranjinha. Padrão de banda C de fêmeas (A) e machos (B).....	34
Figura 06. Metáfase mitótica de <i>Hypostomus. regani</i> , tratada com Ba(OH) <sub>2</sub> .....	35
Figura 07. Metáfases de <i>H. albopunctatus</i> e <i>H. regani</i> hibridizadas por sondas DNAr 18S.....	35

### Capítulo II

Figura 08. Mapa das localidades das coletas.....	41
Figura 09. Cariótipo de <i>H. aff. ancistroides</i> , coloração convencional Giemsa.....	43
Figura 10. Metáfase evidenciando o padrão de Heterocromatina em <i>H. aff. ancistroides</i> ; em destaque, cromossomos portadores das RONS em diferentes tratamentos.....	43
Figura 11. Cariótipo de <i>H. commersonii</i> , coloração convencional Giemsa.....	44
Figura 12. Metáfase evidenciando o padrão de Heterocromatina em <i>H. commersonii</i> , em destaque, cromossomos portadores das RONS em diferentes tratamentos.....	44
Figura 13. Cariótipo de <i>H. derbyi</i> , coloração convencional Giemsa.....	45
Figura 14. Metáfase evidenciando o padrão de Heterocromatina em <i>H. derbyi</i> , em destaque cromossomos portadores das RONS em diferentes tratamentos.....	45

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Quadro comparativo entre as espécies *H. albopunctatus* e *H. regani*.....33

Tabela 2. Quadro comparativo entre as espécies *H. commersonii*, *H. aff. ancistroides* e *H. derbyi*.....49

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. Aspectos gerais da família Loricariidae.....	01
1.2. Aspectos Cariotípicos e Filogenéticos.....	03
1.2.1. Aspectos Gerais.....	03
1.2.2. Nos Loricariidae.....	04
1.3. Técnicas e avanços em citogenética de peixes.....	08
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Material Biológico.....	13
3.2. Métodos.....	14
3.2.1. Para obtenção das metáfases mitóticas.....	14
3.2.2. Método da coloração convencional- Giemsa.....	15
3.2.3. Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C).....;	15
3.2.4. Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs).....	16
3.2.5. Dupla Coloração CMA <sub>3</sub> /DAPI.....	17
3.2.6. Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sonda de DNAr 18S.....	17
3.2.7. Fotomicrografia.....	21
3.2.8. Identificação dos cromossomos e montagem dos cariótipos.....	22
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPITULO I – Distintos padrões evolutivos em duas espécies simpátricas</b>	
<b>de <i>Hypostomus</i> (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE).....</b>	<b>24</b>
<b>CAPITULO II – Caracterização citogenética de três espécies alopátricas de</b>	
<b><i>Hypostomus</i> LACÉPÈDE (1803) (TELEOSTEI, LORICARIIDAE).....</b>	<b>37</b>

<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## 1 Introdução

### 1.1 Aspectos Gerais da Família Loricariidae

Os Siluriformes representam um dos grupos mais diversos e amplamente distribuídos entre os Ostariophysi contando com mais de 36 famílias, aproximadamente 477 gêneros e mais de 4620 espécies nomeadas, das quais 3088 são consideradas válidas (FERRARIS, 2007).

A diversidade de forma, tamanho do corpo e habitat dos Siluriformes sul-americanos, especialmente na superfamília Loricariidae é considerável. Entre eles estão incluídos as três mais diversas famílias de Siluriformes neotropicais: Loricariidae (716 espécies), Trichomycteridae (207 espécies) e Callichthyidae (194 espécies) que contribuem com mais de dois terços das espécies de Siluriformes no continente Sul Americano (FERRARIS, 2007; REIS *et al.*, 2003).

Uma expectativa sobre a diversidade da ictiofauna de águas continentais da região Neotropical estima em aproximadamente 8.000 espécies (SCHAEFER, 1998). A família Loricariidae representa cerca de 10% deste total, com aproximadamente 716 espécies reconhecidas (FERRARIS, 2007) e cerca de outras 116 ainda não nomeadas (ARMBRUSTER, 2004). Seus representantes, popularmente conhecidos como cascudos ou limpa-vidros, estão distribuídos em quase toda América do Sul e Costa Rica Central. Os Loricariidae são agrupados em seis subfamílias: Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae (ARMBRUSTER, 2004) e Delturinae (REIS, 2006). O número diplóide dos Loricariidae varia de  $2n = 34$  (*Ancistrus cuiabae*) (MARIOTTO *et al.*, 2009) à  $2n = 96$  (*Upsilonodus* sp.) (KAVALCO *et al.*, 2004).

Embora a família Loricariidae tenha sido reconhecida como um grupo monofilético (DE PINNA, 1998), poucas hipóteses filogenéticas foram elaboradas para o grupo (GOSLINE, 1947). Lithogeneinae é a subfamília mais primitiva (SCHAEFER, 2003), sendo seguida pelas subfamílias Delturinae (REIS, 2006), Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae (DE PINNA, 1998). Recentemente ARMBRUSTER (2004) agrupou os clados Hypostominae e Ancistrinae, sendo agora, Ancistrinii uma tribo dentro dos Hypostominae.

Os Loricariidae se alimentam geralmente de algas, considerados, portanto, nos primeiros níveis da cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos neotropicais. Seus hábitos alimentares estão estritamente relacionados com sua boca em forma de ventosas e também com sua dentição raspadora, se alimentando também de restos vegetais e pequenos invertebrados, elementos importantes em sua dieta (DE PINNA, 1998). Foi descrito para este grupo algumas espécies com respiração aérea, assim como o uso do estômago como órgão deste tipo de respiração (GRAHAM, 1997; GRADWELL, 1971).

A subfamília Hypostominae é composta por 37 gêneros (ARMBRUSTER, 2004), sendo *Hypostomus* o gênero dominante nos rios brasileiros (BRITSKI, 1972). Por apresentarem uma grande variabilidade de morfologia e coloração e devido à ausência de revisões taxonômicas mais recentes, a identificação ao nível de espécie se apresenta problemática para este grupo, refletindo o que acontece na família Loricariidae como um todo.

## 1.2 Aspectos Cariotípicos e Filogenéticos

### 1.2.1 Aspectos Gerais

A utilização de dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) e para elaboração de padrões de relacionamento ou filogenias (citosistemática) foi inicialmente proposta por MATHEY (1949) no primeiro trabalho de revisão de dados cromossômicos de vertebrados.

A citogenética tenta estabelecer relações entre variáveis genéticas e demográficas, onde a partir de dados sobre o número diplóide ( $2n$ ), o número fundamental (NF) e padrões de diversas técnicas de bandamento, se possam elaborar padrões de relacionamento ou filogenias, além da identificação de espécies e/ou possíveis vias de especiação (MATHEY, 1949). Historicamente estas premissas têm sido consagradas no emprego de marcadores cariotípicos, principalmente na identificação de alguns táxons e na elaboração de hipóteses evolutivas e relação de parentesco entre alguns grupos.

A citogenética em peixes torna-se especialmente interessante porque estes animais constituem um grupo particular dentre os vertebrados pelo número de espécies, diversidade de formas, comportamento, habitat e pela posição central que ocupam na evolução animal (OHNO, 1970). BERTOLLO *et al.* (1986) ressaltam as contribuições de citogenética na taxonomia, sendo elas: uma boa caracterização cromossômica das espécies, relações evolutivas dos cromossomos e cariótipos, auxílio para a identificação de espécies com problemas taxonômicos e a evidência de possíveis casos de espécies crípticas.

Embora informações de diferentes espécies estejam cada vez mais disponíveis devido ao incremento das atividades de pesquisa neste campo, o conhecimento de cariótipos de peixes é ainda reduzido quando comparados aos de mamíferos e outros grupos de seres vivos. A dificuldade na análise dos cromossomos de peixes deve-se, principalmente, ao seu reduzido tamanho e a falta de resolução de algumas técnicas de bandamento (BRUM, 1995). Acredita-se que isso seja um reflexo da falta de compartimentalização (MEDRANO *et al.*, 1988 apud SOLA *et al.*, 1993), ou mesmo um grau menor de compartimentalização do DNA no genoma dos peixes.

Em peixes neotropicais, embora a diversidade seja a nível de megafauna, algumas tendências evolutivas podem ser apontadas para o cariótipo dos principais táxons. Padrões mais conservados da macroestrutura cariotípica podem ser observados em Hypoptopomatinae e Neoplecostominae ao passo que outros grupos demonstram maior diversidade tanto da macroestrutura quanto da microestrutura cariotípica. Entre estes destacam-se Loricariinae e Hypostominae, cuja tribo Ancistrinii apresenta uma tendência de redução em seu número diploide e Hypostominiini possui um padrão evolutivo que gera um aumento no número de cromossomos (ARTONI e BERTOLLO, 2001).

### **1.2.2 Nos Loricariidae**

O número diplóide de 54 cromossomos parece ser a condição plesiomórfica nesta família, cujo  $2n$  varia de 34 (MARIOTTO *et al.*, 2009) a 96 (KAVALCO *et al.*, 2004). Todas as populações das subfamílias Neoplescominae e Hemipsilichthiinae apresentam 54 cromossomos. Dentre os Hypoptopomatinae, 12 das 14 espécies possuem este



caráter também, portanto estas subfamílias são consideradas basais (ALVES, 2000)

(Fig. 01).

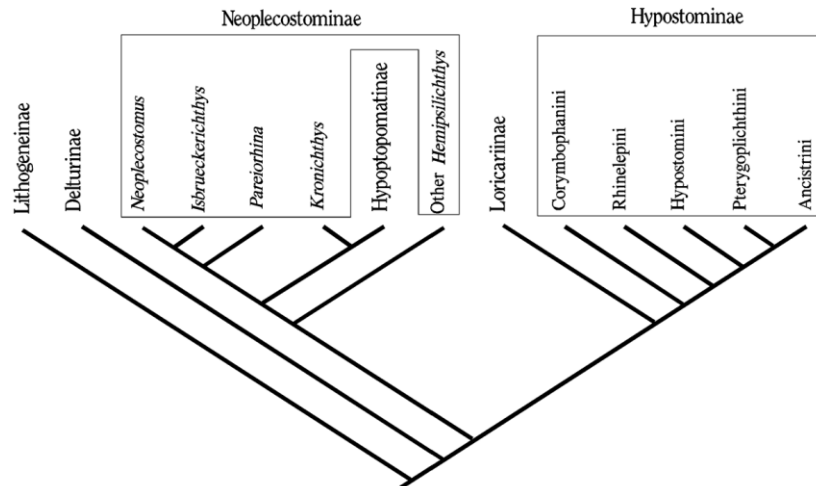


Figura 01 - Relações filogenéticas entre as subfamílias de Loricariidae (ARMBRUSTER, 2004; REIS *et al.*, 2006)

Os Loricariidae apresentam além da alta variabilidade numérica uma grande diversidade estrutural, com entidades taxonômicas de mesmo epíteto com fórmulas cariotípicas distintas (GIULIANO-CAETANO, 1998), como mostra a figura 02.

Dentre os Hypostominae, *Hypostomus* é o gênero mais diversificado cariotipicamente dentre as espécies já estudadas sobre este aspecto entre os Loricariidae (GIULIANO-CAETANO, 1998). Apresentam uma variação no número diplóide de  $2n = 54$  em *H. plecostomus* (MURAMOTO *et al.*, 1968) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. 2 (CEREALI *et al.*, 2006).

No gênero *Hypostomus*, prevalece uma tendência de que cromossomos metacêntricos e submetacêntricos estejam presentes em maior quantidade em

espécimes cujo número diplóide é menor, enquanto a quantidade de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos tende a ser em maior número nos exemplares cujo número diplóide é maior (ARTONI e BERTOLLO, 2001). Ainda segundo ARTONI e BERTOLLO (2001) as fissões cêntricas são rearranjos de relevante importância na evolução do cariótipo deste grupo, uma vez que estes rearranjos robertsonianos são potencialmente responsáveis pelo alto número diplóide encontrado nas espécies mais derivadas deste grupo.

Atualmente, 19 espécies do gênero *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) são reconhecidas como pertencentes à bacia do Alto Rio Paraná (WEBER, 2003). No entanto, até mesmo as espécies descritas apresentam problemas em sua identificação, devido à ausência de revisões mais recentes no grupo, além da falta de conhecimento geral da distribuição destes peixes nos complexos hídricos da América do Sul (REIS *et al.*, 1990).

Subfamily	Species	Sample locality	2n	Bs	Chromosomal types			
					M	SM	ST	A
Hypoptopomatinae	<i>Hisonotus gibbosus</i>	Betari River (SP)	58	—	—	—	—	—
	<i>Microlepidogaster depressicauda</i>	Santo Inácio River (SP)	54	—	14	28	2	10
	<i>Microlepidogaster leucofrenatus*</i>	Poço Grande River (SP)	54	1 to 2	—	48	8	—
	<i>Microlepidogaster leucofrenatus*</i>	Marumbi River (PR)	54	1 to 2	22	24	4	2
	<i>Microlepidogaster sp 1</i>	Alambari River (SP)	54	—	30	20	4	—
	<i>Microlepidogaster sp 2</i>	Moia Stream (SP)	54	—	22	28	4	—
	<i>Microlepidogaster sp</i>	Jacutinga Stream (SP)	54	—	—	—	—	—
	<i>Microlepidogaster sp</i>	Quinta Stream (SP)	54	—	—	—	—	—
	<i>Otocinclus aff. vestitus</i>	Livramento River (PA)	72	—	22	12	4	34
	<i>Otocinclus affinis</i>	Biguá River (SP)	54	—	46	8	—	—
	<i>Otocinclus affinis</i>	Bonito River (RJ)	54	—	40	12	2	—
	<i>Pseudocinclus maculicauda</i>	Poço Grande River (SP)	54	—	20	32	2	—
	<i>Pseudocinclus tietensis*</i>	Grande River (SP)	54	—	26	20	6	—
	<i>Pseudotethys obtusa</i>	Itanhaém River (SP)	54	—	26	18	4	6
	<i>Haritia kroni</i>	Betari River (SP)	58	—	42	—	16	—
Loricariinae	<i>Haritia loricariformis</i>	Grande Stream (SP)	52	—	32	—	20	—
	<i>Haritia loricariformis</i>	Paraitinga River (SP)	56	—	16	22	10	8
	<i>Loricaria sp</i>	Solimões River (AM)	62	—	—	—	—	—
	<i>Loricaria sp</i>	Paraná River (PR)	64	1 to 5	10	6	4	44
	<i>Loricaria sp</i>	Guaíba River (RS)	66	—	2	2	—	62
	<i>Loricaria macrodon</i>	—	58	—	18	2	38	—
	<i>Loricaria parva</i>	—	48	—	—	—	—	—
	<i>Loricaria proluxa</i>	Paraná River (PR)	62	1 to 5	20	4	—	38
	<i>Loricariichthys sp</i>	Paraná River (ARG)	54	—	6	26	4	18
	<i>Loricariichthys platymetopom*</i>	Paraná River (PR)	54	—	6	20	4	24
Loricariinae			54	—	7	20	4	23
	<i>Rineloricaria sp</i>	Betari River (SP)	70	—	2	—	68	—
	<i>Rineloricaria kroni</i>	Cavalo Stream (RS)	64	—	6	—	58	—
	<i>Rineloricaria kroni</i>	Itapocu River (SC)	64	—	6	—	58	—
	<i>Rineloricaria latirostris</i>	Passa Cinco River (SP)	44	—	12	4	—	28
			44	—	10	4	—	30
			44	—	13	2	—	29
			44	—	13	4	—	27
			44	—	13	1	—	30
			44	—	10	4	—	30
			44	—	10	3	—	31
	<i>Rineloricaria latirostris</i>	Passa Cinco River (SP)	46	—	10	3	—	33
	<i>Rineloricaria latirostris</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	36	—	24	—	12	—
			37	—	23	—	14	—
			38	—	22	—	16	—
			39	—	21	—	18	—
Loricariinae	<i>Rineloricaria latirostris</i>	Três Bocas Stream (PR)	40	—	20	—	20	—
			43	—	17	—	26	—
			44	—	16	—	28	—
			46	—	14	—	32	—
			47	—	13	—	34	—
			48	—	12	—	36	—
	<i>Rineloricaria latirostris</i>	Passa Cinco River (SP)	44	—	16	—	28	—
			45	—	15	—	30	—
			46	—	14	—	32	—
			47	—	13	—	34	—
Ancistrinae	<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	Keller Stream (PR)	56	—	8	—	48	—
	<i>Sturisoma cf. nigrirostrum</i>	Araguaia River (MT)	74	—	20	18	36	—
	<i>Ancistrus sp</i>	Paraná River (PR)	48	—	18	14	12	4
	<i>Ancistrus sp</i>	Betari River (SP)	52	—	32	—	20	—
	<i>Ancistrus sp</i>	Itapocu River (SC)	52	—	28	—	24	—
	<i>Ancistrus sp</i>	São Francisco Stream (AC)	38	—	30	—	8	—
	<i>Hemiancistrus sp</i>	Rio Araguaia (MT)	52	—	20	20	12	—
	<i>Megalancistrus aculeatus</i>	Rio Paraná (PR)	52	—	26	26	—	—
	<i>Panaque cf. nigrolineatus</i>	Rio Araguaia (MT)	52	—	26	20	6	—
	<i>Uspilodus sp</i>	Paraitinga River (SP)	96	—	16	8	—	72
Uspilodinae	<i>Hypostomus affinis</i>	Jacuí Stream (SP)	66	—	14	14	12	26
	<i>Hypostomus albopunctatus</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	74	—	10	20	44	—
	<i>Hypostomus ancistroides</i>	Monjolinho Stream (SP)	68	—	16	18	34	—
	<i>Hypostomus aff. auroguttatus</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	76	—	8	30	38	—
	<i>Hypostomus emarginatus</i>	Araguaia River (MT)	52	—	16	30	6	—
	<i>Hypostomus macrops*</i>	—	68	—	10	14	44	—
	<i>Hypostomus paulinus</i>	—	74	—	10	20	44	—
	<i>Hypostomus plecostomus</i>	—	54	—	24	—	12	18
	<i>Hypostomus regani</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	72	—	10	20	42	—
	<i>Hypostomus sp A</i>	Rincão Stream (SP)	70	—	18	14	38	—
Hypostominae	<i>Hypostomus sp B</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	72	—	12	18	42	—
	<i>Hypostomus sp B</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	72	—	13	18	41	—
	<i>Hypostomus sp D<sup>1</sup></i>	Mogi-Guaçu River (SP)	72	—	10	26	36	—
	<i>Hypostomus sp D<sup>2</sup></i>	Mogi-Guaçu River (SP)	72	—	14	20	38	—
	<i>Hypostomus sp E</i>	Mogi-Guaçu River (SP)	80	—	8	16	56	—
	<i>Hypostomus sp F</i>	São Francisco River (MG)	76	—	10	16	50	—
	<i>Hypostomus sp F</i>	São Francisco River (MG)	75	—	10	17	48	—
	<i>Hypostomus sp G*</i>	Araguaia River (MT)	64	—	14	24	26	—
			64	—	15	24	25	—
	<i>Hypostomus sp 1</i>	Quinta Stream (SP)	72	—	—	—	—	—
Hypostominae	<i>Hypostomus sp 2</i>	Alambari Stream (SP)	68	—	—	—	—	—
	<i>Hypostomus sp 2</i>	Lost River (MS)	84	—	6	16	62	—
	<i>Hypostomus sp 3</i>	Parapanema River (SP)	66	—	—	—	—	—
	<i>Hypostomus sp 4</i>	Hortelã Stream (SP)	76	—	—	—	—	—
	<i>Liposarcus anisitsi</i>	Preto River (SP)	52	—	16	24	8	4
	<i>Liposarcus sp</i>	Tietê River (SP)	52	—	—	—	—	—
	<i>Rhiniepsis aspera</i>	Paraná River (PR)	54	—	20	26	8	—
	<i>Pogonopoma wertheimeri</i>	Macuri River (BA)	54	—	20	30	4	—
	<i>Pterygoplichthys multiradiatus</i>	Solimões River (AM)	52	—	—	—	—	—
	<i>Neoplecostomus microps</i>	Grande Stream (SP)	54	—	42	—	12	—
Neoplecostominae	<i>Neoplecostomus microps</i>	Pindamonhangaba City	54	—	42	—	12	—
		Grande Stream (SP)	54	—	42	—	12	—
	<i>Neoplecostomus microps</i>	Campos do Jordão City	54	—	24	20	10	—
	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Paraitinga River (SP)	54	—	36	—	18	—
	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	Hortelã Stream (SP)	54	—	38	—	16	—
	<i>Kronichthys heylandi</i>	Betari River (SP)	54	—	50	—	4	—
	<i>Hemipsilichthys splendens</i>	São João River (SC)	54	—	50	—	4	—
	<i>Hemipsilichthys steindachneri</i>	Cavalo Stream (SC)	54	—	40	—	14	—
	<i>Pareiorhina rudolphi</i>	Grande Stream (SP)	54	—	48	—	6	—
			54	—	48	—	6	—

Figura 02 - Dados citogenéticos referentes à família Loricariidae (KAVALCO et al., 2005), com modificações.

### 1.3.3 Técnicas e avanços em citogenética de peixes

Os principais estudos realizados pela citogenética de peixes têm sido feitos através de técnicas convencionais, como coloração Giemsa, bandamento C (banda-CBG) e impregnação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de Prata (Ag-RONs) uma vez que bandamentos longitudinais, tipo bandamento G (banda-GTG), são menos facilmente obtidos em cromossomos de peixes (ARTONI *et al.*, 2000).

Através do bandamento C, há uma remoção diferencial de DNA na região eucromática, enquanto que a região mais condensada permanece relativamente intacta e detectável (SUMNER, 1972). Em geral, a heterocromatina é definida como um segmento do cromossomo que se apresenta condensado, com pouca ou nenhuma atividade transcricional, composto de DNA altamente repetitivo, que se replica tardiamente na fase S e manifesta heteropicnose positiva ou negativa se submetida a determinados tratamentos. Embora genérica, esta definição apresenta exceções em cada um de seus itens. Mudanças relacionadas com quantidade e distribuição de heterocromatina nos cromossomos têm sido relatadas como mecanismo de evolução cariotípica em alguns grupos de peixes (ARTONI *et al.*, 1999; MARGARIDO e GALETTI Jr., 2000). A técnica da banda C em peixes tem sido o método mais utilizado para estudo das regiões heterocromáticas. No entanto, fluorocromos e enzimas de restrição também têm sido empregados na detecção da diferenciação heterocromática, possibilitando a identificação de cromossomos homólogos, polimorfismos na heterocromatina e cromossomos Bs ou sexuais SCHWEIZER *et al.* (1976).

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) têm sido evidenciadas comumente através da técnica de impregnação por nitrato de Prata, que permite localizar sítios ativos de genes ribossomais nos cromossomos (HOWELL e BLACK, 1980). A presença de uma proteína ácida nas RONs ativas na intérfase precedente à mitose na qual a célula sofreu fixação, parece ser responsável pela coloração com nitrato de Prata e na sua consequente identificação (HSU *et al.*, 1975). Assim, esta técnica pode ser considerada como método indireto de localização das RONs, uma vez que não há associação entre o nitrato de Prata e os DNAr propriamente ditos. A caracterização do número e posição das RONs tem sido muito utilizada em peixes e pode constituir um excelente marcador citotaxonômico para alguns grupos onde é mais estável (AFFONSO, 2000) contudo, pode variar de modo inter e intra-específico ou inter e intra-individual quanto ao número, localização, intensidade e tamanho (GOODPASTURE e BLOOM, 1975).

Devido às dificuldades em se obter bons padrões de bandamento G e C em algumas espécies de peixes, possivelmente devido às peculiaridades da estrutura e compactação de seu DNA (MEDRANO *et al.*, 1988 apud SOLA *et al.*, 1993), têm-se utilizado técnicas alternativas, como enzimas de restrição (ER) que caracterizam-se pela habilidade de reconhecer sequências específicas no DNA e orientar seu corte. Elas induzem alterações estruturais nos cromossomos metafásicos relacionados a características estruturais específicas de bandamentos cromossomos, refletindo uma distribuição de sequências diferentes de DNA nos cromossomos (FERNANDEZ *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 1999). Os padrões obtidos dependem da espécie e enzima utilizados.

Estas técnicas são capazes de caracterizar regiões cromossômicas, facilitando a discriminação entre cariótipos aparentemente similares e revelando mecanismos de rearranjos, sendo úteis na identificação de marcadores para espécies e/ou populações e no estabelecimento de homeologias (OZOUF-COSTAZ e FORESTI, 1992 apud AFFONSO, 2000).

Recentemente, métodos mais apurados utilizando corantes fluorescentes e hibridação *in situ* têm se mostrado ferramentas importantes para o entendimento da composição e estrutura dos cromossomos.

A utilização de fluorocromos base-específicos, como Cromomicina A<sub>3</sub>, Mitramicina, Quinacrina, DAPI entre outros, permite identificar regiões ricas em AT ou GC, dependendo de sua especificidade. Assim, segmentos cromossômicos, como heterocromatina e RON, têm sido investigados com maior confiabilidade. Em algumas espécies de peixes, este método tem mostrado diferenças qualitativas entre as heterocromatinas do complemento cromossômico (MARGARIDO e GALETTI Jr., 2000) e na maioria dos teleósteos as RONS têm se mostrado sítios ricos em bases GC (AMEMIYA e GOLD, 1986). No entanto, deve-se ter cautela em afirmar tal consideração, já que tais fluorocromos podem revelar segmentos heterocromáticos não relacionados aos *clusters* ribossomais (ARTONI *et al.*, 1999).

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) constitui um método mais sensível que a marcação pela Prata e/ou fluorocromos na detecção de sítios contendo sequências de genes ribossomais. Estes genes, nos eucariotos, estão organizados em duas famílias multigênicas: a família de DNAr 45S, que codifica para os RNAr 18S, 5,8S e 28S e uma família menor DNAr 5S. As sequências formadoras das RONS são detectadas através de

sondas de DNA 18S e 28S, e pela sonda 5S são detectados DNAr com alto número de cópias de seqüências dispostas em *tandem*. Estes sítios de DNAr 5S não são identificáveis por metodologias convencionais de visualização das RONS e parecem seguir um mecanismo de evolução independente dos sítios 45S de DNAr (MARTINS e GALETTI, 1999).

Assim sendo, importantes subsídios têm sido fornecidos pela Citogenética Clássica e Molecular de Peixes, para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, podendo ser considerada uma excelente ferramenta utilizada em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e genética molecular, para se chegar mais próximo a uma real história evolutiva dos organismos (ARTONI *et al.*, 2000).

## 2 Objetivos

Pretendeu-se, com a caracterização citogenética de espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus*, reunir dados, muitos dos quais ainda inéditos, sobre o padrão cromossômico deste grupo, e correlacioná-los com estudos citogenéticos já realizados, procurando compreender melhor os processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica, podendo se chegar mais próximo a uma real história evolutiva do grupo como um todo.

Para tanto, foram propostas:

- a) Determinar o número diplóide ( $2n$ ) e número fundamental (NF) dos exemplares;
- b) Localizar as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) por impregnação por nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e os DNAr maior e menor com sondas frias de DNAr 18S;
- c) Analisar a distribuição da heterocromatina constitutiva através de bandamento C;
- d) Investigar a natureza das heterocromatinas através do emprego de fluorocromos AT e GC específicos;
- e) Comparar os padrões encontrados nestas espécies, através das técnicas acima citadas, observando a existência ou não de variações a nível individual, populacional e específico e em relação a outros Siluriformes.



### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Material biológico

Foram analisados dez espécimes de *Hypostomus regani* (4 machos, 4 fêmeas e 2 de sexo indeterminado), e doze exemplares de *Hypostomus albopunctatus* (8 machos e 4 fêmeas), capturados por rede de espera noturna montadas ao longo do rio Laranjinha, localizado no município de Sapopema - PR (Fig. 03); doze espécimes de *Hypostomus* aff. *ancistroides* (7 machos e 5 fêmeas) do clube da lagoa, localizado no município de Ponta Grossa PR; cinco espécimes de *Hypostomus derbyi* (3 machos e 2 fêmeas) coletados no Parque Costa, localizado no município de Curitiba – PR; 2 espécimes de *Hypostomus commersonii* (2 fêmeas) coletados na represa da Usina Ney Braga, da COPEL, localizada no município de Mangueirinha – PR.

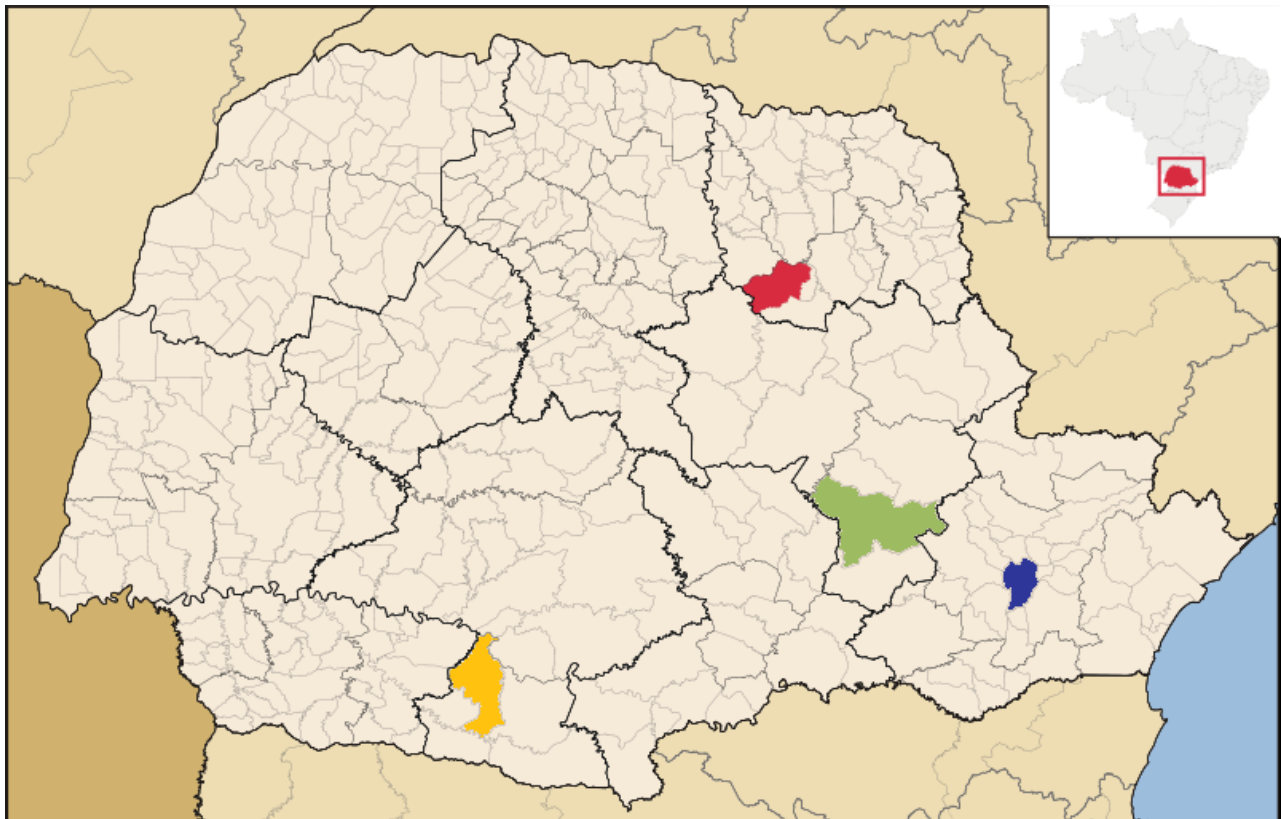


Figura 03 - Municípios do estado do Paraná onde foram realizadas as coletas dos espécimes; Sapopema em vermelho; Ponta Grossa em verde; Curitiba em azul e Mangueirinha em amarelo.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Para obtenção das metáfases mitóticas;

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos de curto tempo descrita por FENOCCHIO *et al.* (1991) com algumas modificações como segue:

- Retirar as porções anterior e posterior do rim (aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>) e transferir para uma placa de Petri contendo 5ml de meio de cultura (RPMI + 20% de soro bovino fetal + antibiótico e antimicótico);
- Desagregar o tecido com pinças de ponta fina com posterior aspersão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha. Incubar a solução com células em estufa a 29°C por 8 horas. 1h30min antes de completar o tempo, pingar 3 gotas (aproximadamente 150µL) de colchicina (0,025%) em cada recipiente. Agitar gentilmente a placa de Petri para que a solução de colchicina se homogeneíze a aquela da placa. Manter a nova solução em estufa até o tempo final da cultura;
- Passado este tempo, transferir a cultura para um tubo de ensaio e centrifugar a 800-900 rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e completar o tubo até 8ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). Desagregar o botão celular na solução por suspensão e mantê-lo 40 minutos em estufa a 37°C;
- Preparar o fixador com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e manter sob refrigeração a 4°C. Dado o tempo da hipotonização, ressuspender o material até ficar homogêneo, e centrifugar a 800-900 rpm por 10 minutos;
- Descartar o sobrenadante e em seguida completar o tubo com fixador até o volume de 8ml. Novamente ressuspender o botão celular e centrifugar a solução a 800-900 rpm durante 10 minutos;

- Repetir a etapa anterior duas vezes;
- Descartado o sobrenadante, colocar 1,5 ml de fixador e ressuspender o botão celular. Armazenar a solução em tubo tipo *Eppendorf* em freezer à -20°C.

### **3.2.2 Método da coloração convencional- Giemsa**

Foi gotejada sobre uma lâmina limpa, aquecida ao redor de 60°C, a solução de suspensão celular armazenada no freezer. Corada a lâmina com uma solução de Giemsa à 5% em tampão fosfato (pH 6,8) durante um período de 10 minutos e em seguida lavadas em água corrente e deixadas secar ao ar.

### **3.2.3 Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)**

Foi utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972)

- Levar a lâmina com a solução celular à estufa de 45°C por um dia;
- Transcorrido este tempo, colocá-la em solução de HCl 0,2N a 42°C durante 10 minutos. Em seguida lavá-la com água destilada e deixar secar ao ar;
- Colocar a lâmina em solução de Hidróxido de Bário a 5% ( $\text{Ba (OH)}_2$ ) a 25°C por aproximadamente 1 minuto;
- Inserir rapidamente a lâmina no HCl 0,2N para retirar o excesso de bário e após isso lavar com um jato de água destilada. Em seguida colocá-la em uma solução de 2xSSC (15,53 g de NaCl + 8,82 g de Citrato Trissódico + Água deionizada) durante uma hora a 60°C;
- Decorrido este tempo lavar a lâmina em água destilada e deixar secar ao ar;

- Corar a lâmina com Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos.

### **3.2.4 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)**

A técnica utilizada foi descrita por HOWELL e BLACK (1980), corando as RONs ativas através da utilização de solução aquosa de nitrato de prata. Foram utilizadas as seguintes etapas:

- Pingar as lâminas conforme descrito anteriormente e deixá-las envelhecer por até 5 dias em uma estufa a aproximadamente 45°C;
- Utilizar uma solução aquosa de nitrato de prata a 50% (1g de  $\text{AgNO}_3$  em 2ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) e uma solução aquosa de gelatina a 2% (1g de gelatina em 50ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, acrescentando-se 0,5ml de ácido fórmico). Condicionar esta última em frasco âmbar e mantê-la em geladeira;
- Pingar sobre a lâmina uma gota (~120 $\mu\text{L}$ ) de solução aquosa de gelatina e duas gotas (cerca de 300 $\mu\text{L}$ ) de solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$ , misturar gentilmente e cobrir com uma lamínula. Levá-la em estufa a 60°C. Quando o material adquirir uma coloração dourado-acastanhada, retirar a lâmina da estufa e remover a lamínula com um jato de água destilada e deixar secar ao ar;
- A lâmina pode então ser corada com uma solução de Giemsa (10%) em tampão fosfato pH 6,8 por 15 segundos, lavada e deixada secar ao ar.

### 3.2.5 Dupla Coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI

Foi empregada a técnica de SCHWEIZER *et al.* (1976):

- Colocar 80 µl de solução de Cromomicina A<sub>3</sub> sobre a lâmina recém preparada para observação de cromossomos e cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora;
- Escorrer a lamínula e lavar com água corrente e secar levemente;
- Colocar 80µl de solução DAPI/Antifading, retirar o excesso com papel filtro.

### 3.2.6 – Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de DNAr 18S (PINKEL, 1986)

Para a identificação das regiões de DNAr foi utilizada uma para DNAr 18S obtida via PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004), usando os *primers* NS1 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC – 3' e NS8 5' TCCGCAGGTTTCACCTACGG – 3' (White *et al.*, 1990)

#### Marcação da sonda por *nick translation*

- Para marcação da sonda, foi utilizado o kit *Nick Translation* da Invitrogen.
- Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml a 0°C: 28,3 µl de água em quantidade suficiente para a sonda DNAr 18S e 23,6 µl de água em quantidade suficiente para a sonda DNAr 5S; 7,5 µl de dNTP Mix 10x com dATP mais biotina; 2,7 µl de DNA 18S e 6,4 µl de DNA 5S; 7,5 µl de enzima mix 10x (DNase + DNA polimerase I). O volume final da reação deve ser 45 µl para cada sonda e o volume de água a ser colocado depende da concentração da sonda;

- Misturar e centrifugar brevemente (aproximadamente 5 segundos), incubando à 16°C durante 2 horas;
- Colocar o tubo no gelo após duas horas e checar o tamanho dos fragmentos em gel de agarose (estes devem medir entre 100 e 500 pb);
- Adicionar 7,5 µl de tampão de parada;
- Precipitar o DNA com 5 µl de acetato de sódio 3M e 100 µl de etanol P.A.;
- Incubar à - 20° C por 12h;
- Centrifugar a  $1,63 \times 10^{14}$ g por 10 minutos;
- Centrifugar a  $1,63 \times 10^{14}$ g por 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em 40 µl de água;

#### **Tamanho dos fragmentos em gel**

- Misturar 1 µl da reação de *nick translation* com 1 µl de azul de bromofenol e aplicar em gel de agarose 0,8% e 1 µl brometo de etídio;
- Aplicar a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos;

#### **Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)**

- Lavar as lâminas em tampão PBS uma vez durante 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação;
- Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada (secar);
- Incubar as lâminas em 90 µl de RNase (0,4% RNase/ 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;

- Lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;
- Lavar durante 5 minutos em PBS uma vez;
- Fixar em formaldeído 1% em PBS uma vez, 50 mM  $MgCl_2$  durante 10 minutos à temperatura ambiente;
- Lavar em PBS uma vez por 5 minutos sob agitação;
- Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85%, 100% por 5 minutos cada;
- Desnaturar em série alcoólica, a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;
- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- Desidratar o material em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada;
- Preparar câmara úmida à 37°C;
- Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridização, cobrir com lamínula e deixar 12h à 37°C;

### **Solução de Hibridação: sonda única**

(estringência 77%)

- Misturar 200 µl de Formamida + 80 µl de Sulfato de Dextrano 50% + 40 µl de 20xSSC + 8µl DNA de placenta 10mg/ml + 72µl de  $H_2O$  qsp. Acrescentada a sonda seca.

### **Solução de Hibridação: duas sondas (DOUBLE FISH)**

- Misturar 200 µl de Formamida + 80 µl de Sulfato de dextrano 50% + 8 µl de DNA de placenta 10mg/ml + 36 µl de H<sub>2</sub>O qsp. Acrescentada a sonda A + H<sub>2</sub>O qsp. Acrescentada a sonda B.

### **Lavagens**

- Lavar duas vezes em formamida 15%/ 0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada sob agitação;
- Lavar as lâminas três vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada sob agitação;
- Lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;
- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/ 4xSSC por 15 minutos;
- Lavar duas vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;

### **Para a detecção da sonda marcada com biotina**

- Colocar sobre as lâminas 90µl de Streptavidina Invitrogen (1:500 em NFDM) durante uma hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente
- Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;
- Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secar ao ar;



### **Para a detecção de duas sondas Double FISH**

- Montar o mix de anticorpos contendo 792 µl NFDM + 1,6 µl de streptavidina FITC conjugada + 4 µl de anti digoxigenina rodamina conjugada.
- Incubar as lâminas com 100 µl cada do mix de anticorpos durante 1h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, à temperatura ambiente sob agitação;
- Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secar ao ar;

### **Montagem da lâmina com iodeto de propídeo**

- Misturar 200 µl de antifading com 8 µl de iodeto de propídeo (50 µg/ ml);
- Colocar 25 µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

### **Montagem das lâminas com DAPI**

- Misturar 400 µl de antifading mais 1µl de DAPI (0,2 mg/ml);
- Colocar 50 µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

### **3.2.7 Fotomicrografia**

As metáfases que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica foram fotografadas através do sistema de captura digital de imagens, com microscópio Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Image. As

análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software

Case Data Manager Expo 2.0.

### **3.2.8 Identificação dos cromossomos e montagem dos cariótipos**

As medições cromossômicas foram feitas através do software Adobe Photoshop 7.0. A classificação dos cromossomos conforme os valores da relação de braços (RB) foi estabelecida segundo LEVAN, FREGDA e SANDBERG (1964) em: metacêntricos (m) RB= 1,00 a 1,70; submetacêntricos (sm) RB= 1,71 a 3,00; subtelocêntricos (st) RB= 3,01 a 7,00; acrocêntricos (a) RB= maior do que 7,01. Para o cálculo do número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados de dois braços, enquanto que os acrocêntricos constituídos por um único braço.

## **4 Resultados**

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

### Capítulo I

**Distintos padrões evolutivos em duas espécies simpátricas de *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)**

### Capítulo II

**Caracterização citogenética de três espécies alopátricas de *Hypostomus* LACÉPÈDE (1803) (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)**

## CAPITULO I

**DISTINTOS PADRÕES EVOLUTIVOS ENTRE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DO GÊNERO *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE, HYPOSTOMINAE)****Resumo**

A família Loricariidae apresenta aproximadamente 700 espécies, sendo a segunda maior família de peixes neotropicais. Duas espécies de *Hypostomus*, *H. albopunctatus* e *H. regani*, da Bacia do rio Tibagi foram comparadas quanto à estrutura cariotípica, à localização da heterocromatina e do DNAr 18S. Doze espécimes (8 machos e 4 fêmeas) de *H. albopunctatus* e nove espécimes (5 machos e 4 fêmeas) de *H. regani* foram analisados. Como resultado, foi obtido para *H. albopunctatus* o número diplóide modal de  $2n = 76$  cromossomos ( $10m + 14sm + 52st/a$ ) e para *H. regani*,  $2n = 68$  ( $12m + 16sm + 40st/a$ ). Foi detectado um provável sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW nos exemplares de *H. albopunctatus*. Blocos heterocromáticos foram detectados nas porções centroméricas, intersticiais e teloméricas em ambas as espécies. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) mostraram variação intraindividual no número de *cistrons* com até três cromossomos marcados pelo nitrato de Prata em *H. regani*, enquanto que em *H. albopunctatus* apenas um par cromossômico submetacêntrico se mostrou portador de RONS. A variação da atividade das RONS verificadas em *H. regani* foi suportada pelo emprego da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda 18S DNAr com ampliação para até seis diferentes *loci* detectados nesta espécie. Sendo assim foi possível identificar distintas características cromossômicas adquiridas durante a evolução destas espécies, apesar de as mesmas hoje serem simpátricas.

**Palavras chave:** cromossomos sexuais; heterocromatina; RONS; DNAr

## Introdução

*Hypostomus* é um dos gêneros que reuni a maior quantidade de espécies dentre os Loricariidae, representando cerca de 120 espécies descritas (WEBER, 2003). Contudo a discussão acerca das relações filogenéticas do gênero *Hypostomus* é complexa e, apesar do aumento de exemplares coletados, sua correta identificação é complicada, devido às semelhanças morfológicas entre as espécies (ZAWADZKI *et al.*, 2005). Marcadores cromossômicos têm se mostrado eficientes ferramentas para a citotaxonomia em peixes. BERTOLLO *et al.* (1986) ressaltam as principais contribuições da citogenética à taxonomia, como: elucidação de relações evolutivas dos cromossomos e cariótipos, auxílio para a identificação de espécies com problemas taxonômicos e a evidência de possíveis casos de espécies crípticas.

Atualmente, 19 espécies do gênero *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) são reconhecidas como pertencentes à bacia do Alto Rio Paraná (WEBER, 2003). No entanto, até mesmo as espécies descritas apresentam problemas em sua identificação, devido à ausência de revisões mais recentes no grupo, além da falta de conhecimento geral da distribuição destes peixes nos complexos hídricos da América do Sul (REIS *et al.*, 1990). A elucidação taxonômica, em agravo, é um passo fundamental na identificação de espécies ameaçadas, e neste contexto, informações genéticas contribuem na resolução de problemas de identificação e na definição de unidades de conservação para espécies (FRANKHAM *et al.*, 2004).

Este gênero apresenta grande variabilidade quanto ao número diplóide, variando desde  $2n = 54$  em *Hypostomus plecostomus* (MURAMOTO *et al.*, 1968) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. 2 (CEREALI *et al.*, 2006). Destaca-se que *H. emarginatus* foi

recentemente realocada taxonomicamente fora do gênero *Hypostomus* como

*Squaliforma emarginata* (MONTROYA-BURGOS *et al.*, 2002) e assim, o número diplóide de  $2n = 52$  cromossomos (ARTONI e BERTOLLO, 2001) não é mais válido para descrever a extensão da variabilidade do  $2n$  no gênero *Hypostomus*. Se considerarmos ainda que na década de 60 as técnicas de citogenética ainda não eram tão resolutivas e que os problemas de identificação taxonômica neste gênero não eram diferentes daqueles hoje relatados, seria mais prudente considerar a espécie *Hypostomus* sp.G, com menor número diplóide  $2n = 64$  (ARTONI *et al.*, 1998).

Assim, uma constante atualização da variabilidade cariotípica em *Hypostomus* se faz necessária e o presente trabalho teve por objetivo caracterizar o cariótipo de duas espécies, *H. albopunctatus* e *H. regani*, amostradas em simpatria na bacia do rio Tibagi no sistema do Alto Paraná, comparativamente a outras populações destas espécies já descritas cariotipicamente para outras bacias hidrográficas.

## Material e Métodos

Exemplares de *Hypostomus* foram coletados, em simpatria no rio Laranjinha, afluente do rio Tibagi, pertencente à bacia do Alto Paraná, localizado na região de Sapopema – PR (Fig. 04). Foram analisados os cariótipos de 12 espécimes de *H. albopunctatus*, sendo 8 machos e 4 fêmeas e 10 espécimes de *H. regani*, sendo 4 machos, 4 fêmeas e 2 cujo sexo não foi identificado. Os exemplares foram identificados e tombados no Museu de História Natural Capão da Imbuia.

A identificação do sexo foi realizada pela biópsia parcial das gônadas, examinadas a fresco em microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x.

As preparações mitóticas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (BERTOLLO *et al.*, 1978). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram visualizadas com nitrato de Prata coloidal (HOWELL e BLACK, 1980) e a heterocromatina foi evidenciada pelo bandamento C (SUMNER, 1972). A detecção de regiões cromossômicas AT e CG ricas foi realizada através da técnica descrita por SCHWEIZER *et al.* (1976), empregando-se dupla coloração com Cromomicina/DAPI.

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi empregada para localizar os genes de DNAr, utilizando-se a sonda de DNAr 18S obtida de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004). As sondas 18S foi marcada com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal foram realizadas com os seguintes componentes: avidina FITC (Sigma) e anti avidina biotimilada (Sigma). O procedimento geral de hibridação seguiu o protocolo descrito por PINKEL *et al.* (1986). A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Image. As análises cromossômicas foram realizadas *in silico* através do software Case Data Manager Expo 2.0.



Figura 04 - A área do município de Sapopema (em vermelho), onde foram coletados os exemplares de *H. albopunctatus* e *H. regani*

## Resultados e Discussão

As características cariotípicas de número diplóide ( $2n$ ), número de braços cromossômicos (NF) e tipos cromossômicos (m; sm; st; a) que compõe a fórmula cariotípica encontrada para as duas espécies de *Hypostomus* aqui estudadas diferem daquele já descrito anteriormente para as espécies deste gênero, embora reforcem os padrões evolutivos propostos por ARTONI e BERTOLLO (2001). Por outro lado, estas mesmas espécies de *H. albopunctatus* e *H. regani*, encontradas em simpatria apresentam variações na micro e macroestrutura cariotípica que denotam tendências evolutivas.

O  $2n$  encontrado em *H. albopunctatus* foi igual a 76 cromossomos, contudo para fêmeas o NF foi igual a 141, ao passo que os machos apresentaram NF igual a 142 (Tab.



1). A presença de um cromossomo acrocêntrico sem homólogo no cariótipo das fêmeas (10m+14sm+41st+11a), diferentemente dos machos que se apresentaram homogaméticos (10m+14sm+42st+10a), neste caso, sugere a presença de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (Fig. 05).

O padrão de localização da heterocromatina evidenciada pelo bandamento C, além das marcações em regiões teloméricas, pericentroméricas e intersticial em alguns cromossomos do complemento A, também diferenciaram possíveis alossomos. Uma forte marcação na porção intersticial do braço longo 13º cromossomo do complemento identificou o cromossomo Z, enquanto o cromossomo W apresentou um grande bloco heterocromático em quase toda extensão do braço longo (Fig. 05).

Até o momento somente uma espécie do gênero *Hypostomus* sp. G da bacia do Araguaia apresentou cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados – ZZ/ZW (ARTONI *et al.*, 1998). Esta parece ser uma condição altamente apomórfica, pouco comum e homoplásica entre os *Hypostomus* em oposição ao gênero *Ancistrus*, cujo sistema ZZ/ZW altamente diferenciado ocorre com maior frequência, como verificado em *A. dubios* (MARIOTO *et al.*, 2004) que é colocado como grupo irmão e da tribo Ancistrinii.

Este tipo de diferenciação pode estar ligado a rearranjos estruturais, resultando na diminuição de recombinação meiótica (BEÇAK e BEÇAK, 1969; ALMEIDA-TOLEDO *et al.*, 2000). Uma hipótese para tal diferenciação seria a ocorrência da perda do braço curto do proto cromossomo Z, originando então o cromossomo W, já que rearranjos estruturais parecem ter um importante papel na diferenciação de cromossomos sexuais nos loricariídeos, como por exemplo, em *Loricariichthys playmetopon* (SCAVONE e JÚLIO Jr., 1995) e *Hypostomus* sp. G (ARTONI *et al.*, 1998), que também apresentam

sistema ZZ/ZW. No mesmo sentido um processo semelhante parece ter ocorrido em *Ancistrus* sp. “Piagaçu” (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI evidenciou regiões intersticiais ricas em bases GC bem definidas em alguns pares de cromossomos subtelo e acrocêntricos, enquanto regiões ricas em bases AT foram detectadas em porções principalmente centroméricas e teloméricas em alguns cromossomos. O braço longo do cromossomo Z foi corado quase que completamente pela cromomicina, bem como os sinais obtidos nas regiões organizadoras de nucléolo, indicando que nessas regiões, sequências CG devem estar mais disponíveis à coloração por este fluorocromo base-específico (Fig. 07). Por outro lado o cromossomo W não apresentou coloração diferencial por corantes AT ou CG específicos, sugerindo que o DNA repetitivo representado na porção heterocromática deste cromossomo deve possuir uma natureza distinta e heterogênea daquela verificada no cromossomo Z e nas RONS.

Não foi detectado heteromorfismo entre as regiões organizadoras de nucléolos (RONS), estas localizadas apenas em um par cromossômico submetacêntrico correspondente ao 11<sup>o</sup> do complemento cariotípico padrão. Esta condição foi confirmada com o emprego da sonda DNAr 18S pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Fig. 7), descartando a possibilidade de RONS latentes ou inativas nesta espécie.

Ainda os dados cariotípicos aqui levantados para a espécie *H. albopunctatus* procedente do Rio Laranjinha, da Bacia do Alto Paraná, foram divergentes quando comparados com os dados disponíveis na literatura para esta espécie. ARTONI e BERTOLLO (1996) estudaram o cariótipo de *H. albopunctatus* do rio Mogi Guaçu também para a bacia do Alto Paraná e verificaram uma macroestrutura cariotípica muito

diferente com  $2n = 74$  cromossomos (10m+20sm+44st/a) e não verificaram a presença de cromossomos sexuais. Este argumento citotaxonômico pode ser indicativo de especiação alopátrica e pode ser levado em consideração quando da reanálise da real condição taxonômica desta espécie.

A outra espécie simpátrica aqui estudada, *H. regani* apresentou uma constituição cariotípica sem a presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, ao nível das análises realizadas. O número diplóide encontrado foi de 68 cromossomos (12m+16sm+28st+12a) (Tab. 1), com um padrão de localização da heterocromatina verificado pelo bandamento C, em regiões pericentroméricas, teloméricas e intersticiais dos cromossomos (Fig. 6). Algumas bandas C positivas intersticiais, verificadas principalmente em cromossomos subtelo e/ou acrocêntricos, são características do gênero *Hypostomus* e reflete o arranjo dos domínios cromossômicos no núcleo interfásico, possibilitando a dispersão desta classe de cromatina entre cromossomos não homólogos em concerto no cariótipo (ARTONI e BERTOLLO, 1999).

A dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI evidenciou em *H. regani* regiões ricas em bases GC coincidentes com as RONS e com as marcações obtidas pela FISH com a sonda 18S (Fig. 7).

Até três regiões organizadoras de nucléolo foram evidenciadas pela impregnação com nitrato de Prata, duas sobre o maior par subtelocêntrico e uma sobre um cromossomo subtelocêntrico menor (Fig. 7). Por outro lado a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda DNAr 18S sinalizou seis sítios de cromossomos portadores de RONS (Fig. 7), indicando a existência de sítios latentes destes genes ribossomais.

*Hypostomus regani* foi descrito anteriormente com  $2n = 72$  (10m+20sm+42st/a) para uma população do rio Mogi Guaçu no Alto Paraná (ARTONI e BERTOLLO, 1996). No presente trabalho, o número diplóide encontrado foi de  $2n = 68$  (12m+16sm+28st+12a). A fórmula cariotípica encontrada, e principalmente a diferença do número diplóide é um forte indicativo de especiação alopátrica e sugere que alterações cromossômicas estruturais do tipo robertsonianas estejam envolvidas nesta diversificação cariotípica interpopulacional.

Os dados cariotípicos aqui apresentados para as novas populações de espécies de *Hypostomus* com cariótipo já conhecido corroboram a grande diversidade cariotípica evidenciada para este gênero e indicam processos de diferenciação alopátrica, além de caminhos evolutivos distintos interespecificamente mesmo em condição de simpatria.

Ao passo que *H. albopunctatus* durante seu processo evolutivo acumulou características consideradas derivadas para o grupo, tais como o aumento da heterocromatina nos cromossomos do complemento, o desenvolvimento de um dimorfismo cromossômico sexual do tipo ZZ/ZW, cuja heterocromatina constitutiva do cromossomo Z é de origem distinta àquela formadora do cromossomo W, manteve alguma características ancestrais, tal como a manutenção dos sítios 18S em apenas um par de cromossomos, característica esta basal, porém pouco conservada na tribo dos *Hipostominiini*. A evolução cariotípica de *H. regani* caracterizou-se principalmente pela dinâmica dos sítios 18S em relação aos cromossomos do complemento, apresentando 5 sítios ribossomais, dos quais apenas 3 foram considerados ativos, além da conservação de características tais como a baixa quantidade de heterocromatina constitutiva, esta presente apenas em regiões pericentroméricas, teloméricas e adjacentes aos sítios de

DNAr 18S. Ambas populações apresentaram número diplóide superior ao considerado basal para a família, concordando com o padrão evolutivo proposto para a tribo dos *Hypostomini*, com tendência em aumentar o número diplóide devido à eventos robertsonianos (Tab. 1)

	<i>H. albopunctatus</i>	<i>H. regani</i>
2n	76	68
NF	141/142	124
Sistema Sexual	ZZ/ZW	-
Heterocromatina	Regiões intersticiais inclusive no provável cromossomo Z	Pouca, principalmente em regiões pericentroméricas e teloméricas
RONs	Simples	Múltiplas, até 3
CMA <sub>3</sub> /DAPI	Heterocromatina GC	RONs GC, 6 sítios
FISH 18S	Simples	6 sítios
Descrição Anterior	2n = 74	2n = 72

Tabela 1 – Quadro comparativo entre as espécies *H. albopunctatus* e *H. regani*.

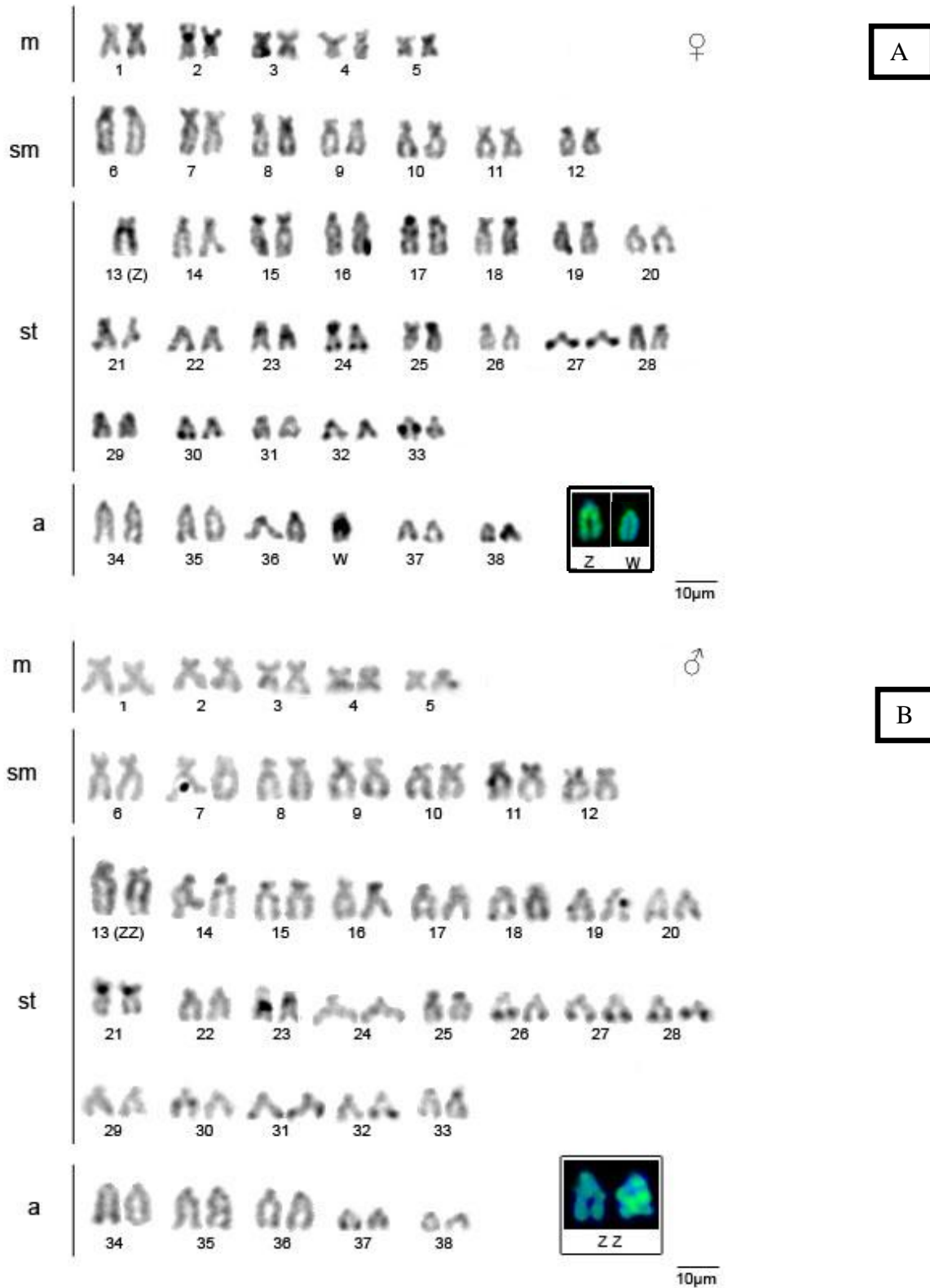


Figura 05 - Cariótipo de *H. albopunctatus*, padrão de bandamento C; em (A) citótipo da fêmea, em destaque os cromossomos Z e W, tratados com CMA<sub>3</sub>/DAPI; em (B) citótipo do macho, em destaque o par de cromossomos ZZ tratados com fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DAPI

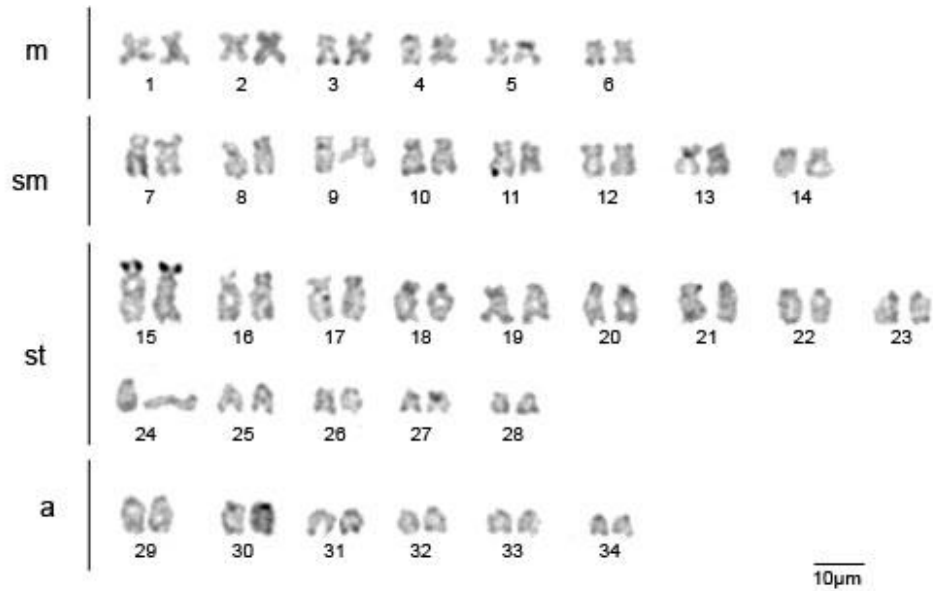


Figura 06 - Cariótipo de *H. regani*, padrão de bandamento C

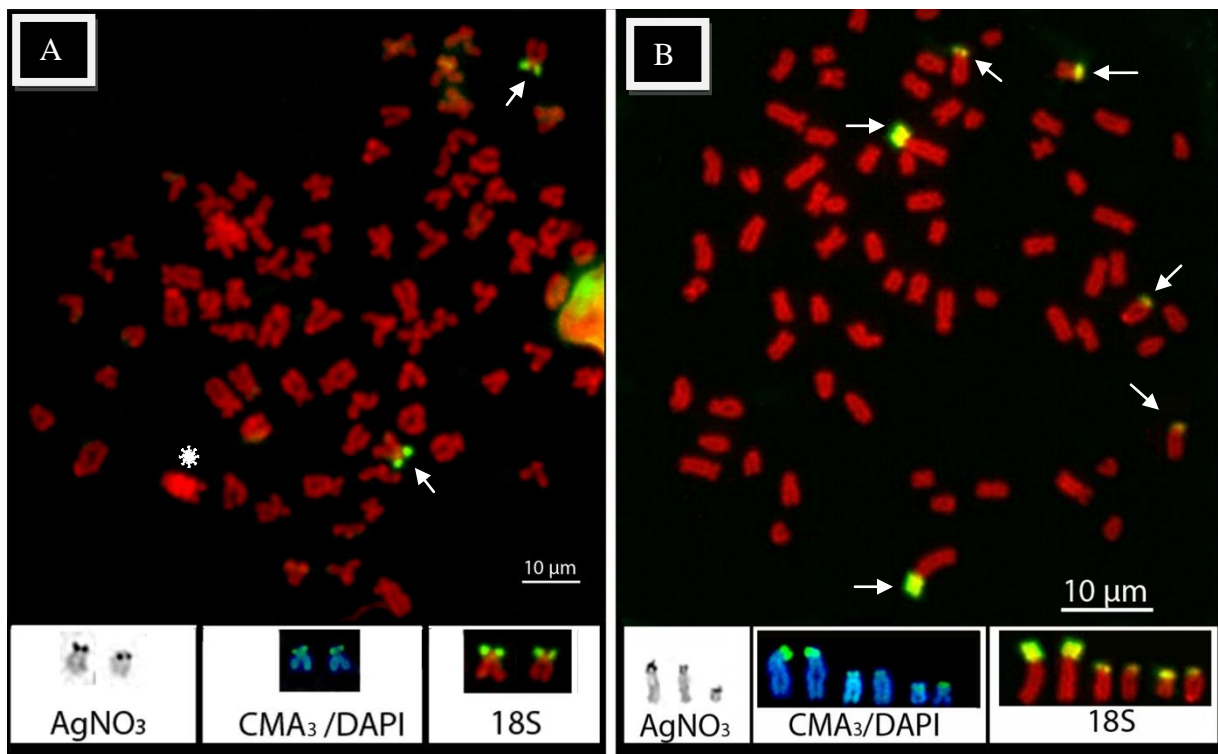


Figura 07 - Metáfases hibridizadas com sondas DNAr 18S; as setas indicam os cromossomos portadores de genes ribossomais, o asterisco o cromossomo Z; em destaque cromossomos portadores da RONS tratados com Nitrato de Prata, Cromomicina/DAPI e hibridizados com sonda DNAr 18S: (A) Metáfase de *H. albopunctatus* e (B) metáfase de *H. regani*.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

## **Referências Bibliográficas**

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.



## CAPITULO II

### CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES ALOPÁTRICAS DE *HYPOSTOMUS* LACÉPÈDE (1803) (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)

#### Resumo

O gênero *Hypostomus* é amplamente distribuído pela América do Sul e um dos mais estudados dentre os Loricariidae, com cerca de 130 espécies descritas. Entretanto, sua correta identificação taxonômica é bastante difícil devido às discretas diferenças morfológicas entre as espécies. Deste modo, dados citogenéticos acerca deste gênero são fundamentais para elucidar a história evolutiva do grupo. Análises citogenéticas foram realizadas em três espécies de *Hypostomus*: uma da bacia do Tibagi - PR (*Hypostomus* aff. *ancistroides*), outras duas da bacia do rio Iguaçu – PR (*Hypostomus commersonii* e *Hypostomus derbyi*). *H* aff. *ancistroides* apresentou  $2n = 66$  (12m; 16sm; 10st; 28a) e  $NF = 104$  com grandes blocos heterocromáticos identificados em dois pares cromossômicos e as regiões organizadoras de nucléolo (RONS) múltiplas foram detectadas em sete cromossomos do complemento. A população de *H. commersonii* apresentou  $2n=68$  (12m; 12sm; 8st; 36a) e  $NF = 100$  com pouca heterocromatina constitutiva localizada principalmente pericentromericamente e as RONS estiveram presentes em apenas 1 par cromossômico. A população de *H. derbyi* apresentou  $2n = 66$  (6m; 10sm; 20 st; 30a) com grandes blocos heterocromáticos dispersos pelo cariótipo e múltiplos sítios de RONS. Estes marcadores cariotípicos se mostraram eficientes para separar as espécies aqui estudadas e corroboram a evolução cariotípica divergente no gênero *Hypostomus*.

**Palavras chave:** Evolução cariotípica; DNAr 18S; RONS; Heterocromatina

## Introdução

Segundo VARI e MALABARBA (1998) 30 a 40% de toda a diversidade existente na ictiofauna Neotropical não foi, até o momento, reconhecida. Apesar disto, peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais importantes para estudos da variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados, uma vez que ocupam uma posição basal na filogenia deste grande grupo (NELSON, 1994). A família Loricariidae apresenta aproximadamente 716 espécies e cerca de 300 outras espécies ainda não descritas (REIS *et al.*, 2003) e faz parte de uma das 36 famílias pertencentes à ordem Siluriformes (FERRARIS *et al.*, 2007). Os peixes pertencentes a esta família são comumente conhecidos como cascudos e habitam quase toda a América do Sul e América Central, desde a Costa Rica até a Argentina.

O gênero *Hypostomus* é, desta família, o que apresenta maior número de espécies já cariotipadas (GIULIANO-CAETANO, 1998), sendo o gênero de cascudos dominante nos rios brasileiros (BRITSKI, 1972). Seu número diplóide varia de  $2n = 54$  em *Hypostomus plecostomus* (MURAMOTO *et al.*, 1968) a  $2n=84$  em *Hypostomus* sp. 2 (CERALI *et al.*, 2006). Alguns problemas taxonômicos necessitam ser revisados, pois, por sua ampla variabilidade morfológica e padrões de coloração, divergências quanto à identificação ao nível de espécie vêm sendo causadas não só para este gênero, mas para os exemplares da família Loricariidae em geral.

A citogenética pode ser utilizada como uma importante ferramenta auxiliar em questões ictio-taxonômicas. As contribuições da citogenética para a taxonomia podem ser obtidas através de boas caracterizações cromossômicas das espécies, bem como das relações evolutivas dos cromossomos e cariótipos podendo evidenciar possíveis

casos de espécies crípticas (BERTOLLO *et al.*, 1986). Um bom exemplo de marcador cromossômico são as regiões organizadoras de nucléolos (RONS), que nos *Hypostomus* são extremamente variáveis, tanto intra quanto interespecificamente. Podem apresentar com frequência polimorfismo de tamanho destas regiões entre cromossomos homólogos, assim como há espécies com apenas um par e outras que apresentam RONS múltiplas (ARTONI e BERTOLLO, 1992).

A diversificação cariotípica representada pela fórmula cariotípica expressa pelos tipos cromossômicos e a localização cromossômica da heterocromatina são marcadores de igual importância que auxiliam tanto na investigação da evolução cariotípica quanto da robustez destes caracteres na citosistemática e citotaxonomia. No gênero *Hypostomus* estes marcadores têm se mostrado promissores e no presente trabalho são aplicados a três espécies, duas delas ainda não conhecidas do ponto de vista cariotípico.

## Material e Métodos

Foram estudados 12 exemplares (7 machos e 5 fêmeas) de *Hypostomus* aff. *ancistroides* no clube Ponta da Lagoa, pertencente à bacia do rio Tibagi, localizado na região de Ponta Grossa – PR (Fig. 08). No lago de inundação da usina Ney Braga, bacia do médio rio Iguaçu, localizada no município de Manguinhos - PR (Fig. 08) foram analisados 2 espécimes do sexo feminino de *Hypostomus commersonii*. Cinco exemplares de *Hypostomus derbyi* foram coletados (3 machos e 2 fêmeas) no Parque Costa, pertencente à bacia do alto rio Iguaçu em Curitiba - PR (Fig. 08). Os exemplares foram identificados taxonomicamente e depositados no Museu de Ictiologia do NUPELIA.

A identificação do sexo foi realizada por biópsia parcial das gônadas, examinadas *a fresco* em microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x.

As preparações mitóticas foram obtidas a partir de células do rim anterior, empregando-se o tratamento “*in vivo*” com colchicina (BERTOLLO *et al.*, 1978). As regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram visualizadas com nitrato de Prata (HOWELL e BLACK, 1980) e a heterocromatina foi analisada pelo bandamento C (SUMNER, 1972).

A detecção de regiões cromatínicas ricas em GC e AT foi realizada através da técnica descrita por SCHWEIZER *et al.* (1976), utilizando dupla coloração com Cromomicina/DAPI.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi empregada para localizar os genes de DNAr, utilizando-se a sonda de DNAr 18S obtida de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004). As sondas 18S foi marcada com biotina 14-dATP por *nick translation*, seguindo as instruções do fabricante (Bionick Labelling System – Invitrogen). A detecção e amplificação do sinal foram realizadas com os seguintes componentes: avidina FITC (Sigma) e anti avidina biotimilada (Sigma). O procedimento geral de hibridação seguiu o protocolo descrito por PINKEL *et al.* (1986). A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Image. As análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software Case Data Manager Expo 2.0.

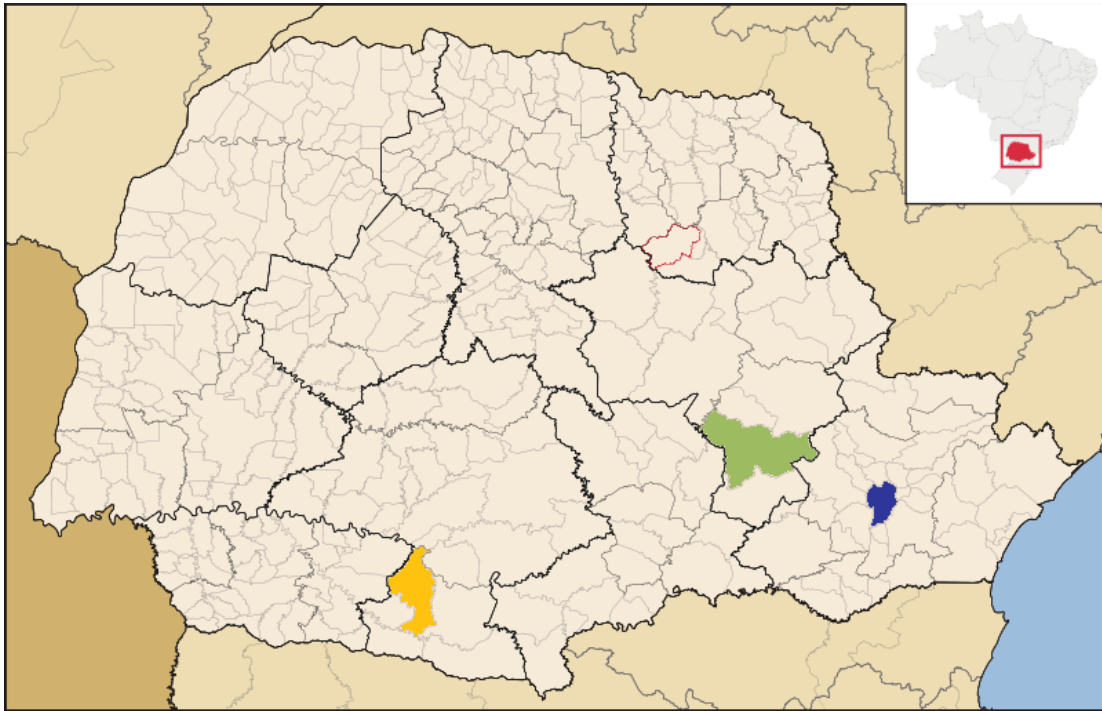


Figura 08 - Mapa das localidades das coletas no estado do Paraná, em Azul – Curitiba, em Verde – Ponta Grossa e em Amarelo – Manguinhos.

## Resultados

*Hypostomus* aff. *ancistroides* apresentou número diplóide igual a 66, sendo destes 12 metacêntricos, 16 submetacêntricos 10 subtelocêntricos e 28 acrocêntricos. De acordo com esta classificação cromossômica, esta espécie apresentou número fundamental igual a 104 (Fig. 09).

O tratamento para banda C revelou dois grandes blocos de heterocromatina em pares de submetacêntricos e uma pequena marcação em pares de cromossomos acrocêntricos (Fig. 10).

A impregnação por Prata evidenciou de 4 a 6 marcações para regiões organizadoras de nucléolo, todas em posições terminais dos braços cromossômicos (Fig.

10). Estas mesmas regiões foram evidenciadas pela dupla coloração CMA<sub>3</sub> /DAPI

como ricas em bases CG (Fig. 10) e diretamente detectadas como portadoras de genes ribossomais através da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas 18S (Fig. 10)

*Hypostomus commersonii* apresentou número diplóide igual a 68, sendo destes 12 metacêntricos, 12 submetacêntricos, 8 subtelocêntricos e 36 acrocêntricos, e número fundamental igual a 100 (Fig. 11) e pouca heterocromatina foi evidenciada pelo bandamento C restrita apenas a regiões centroméricas e teloméricas (Fig. 12).

Através da impregnação com nitrato de Prata foram detectados até 5 cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo (Fig. 12). A dupla coloração DAPI/CMA<sub>3</sub> evidenciou 5 sítios ricos em CG, estes coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolo, detectadas pela impregnação de prata (Fig. 12) e confirmado através da hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sondas DNAr 18S (Fig. 12).

*Hypostomus derbyi* apresentou número diplóide igual a 66, destes 6 metacêntricos, 10 submetacêntricos, 20 subtelocêntricos e 30 acrocêntricos, com número fundamental igual a 82 (Fig. 13)

O bandamento C possibilitou identificar braços cromossômicos dotados de grandes blocos heterocromáticos (Fig. 14)

A impregnação por Prata evidenciou 4 regiões organizadoras de nucléolo (Fig. 14) enquanto a hibridação *in situ* fluorescente, com sondas 18S evidenciou apenas 2 sítios portadores de genes ribossomais (Fig. 14).

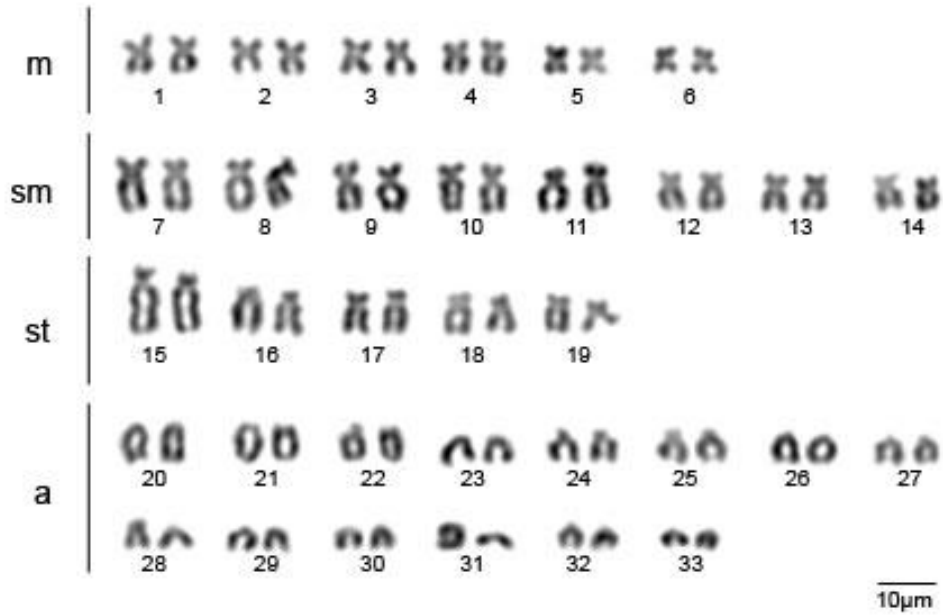


Figura - 09: Cariótipo de *H. aff. ancistroides*, coloração convencional Giemsa

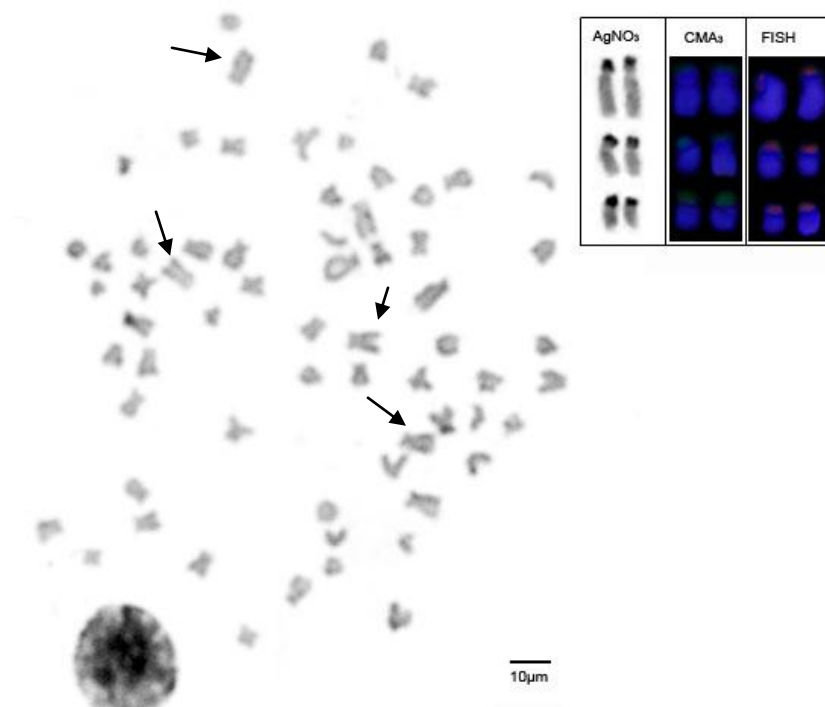


Figura - 10: Metáfase evidenciando o padrão de Heterocromatina em *H. aff. ancistroides*, as setas indicam blocos heterocromáticos; em destaque, cromossomos portadores das RONS em diferentes tratamentos

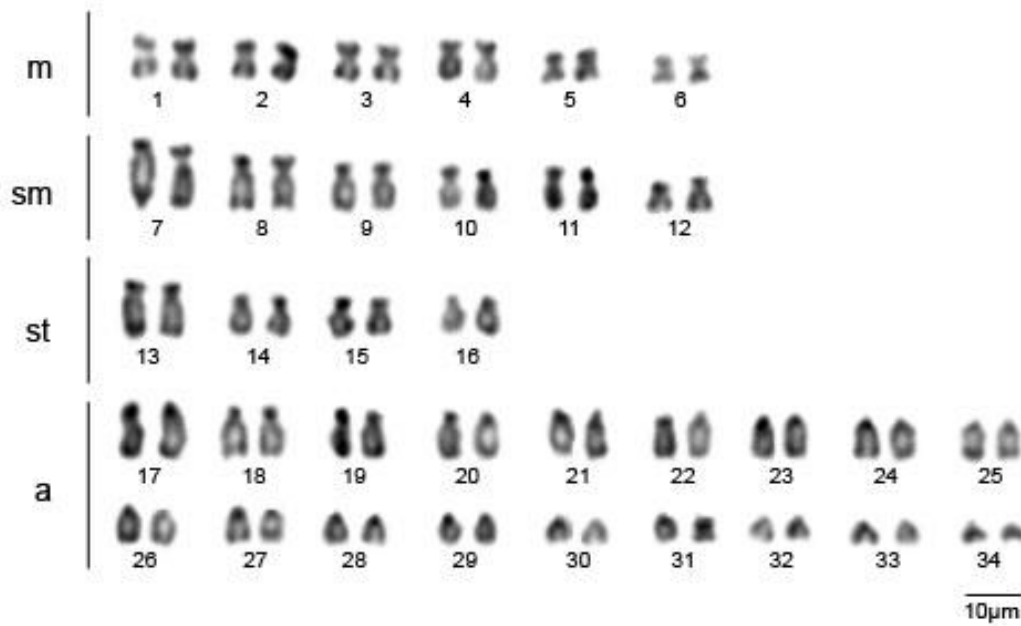


Figura - 11: Cariótipo de *H. commersonii*, coloração convencional Giemsa

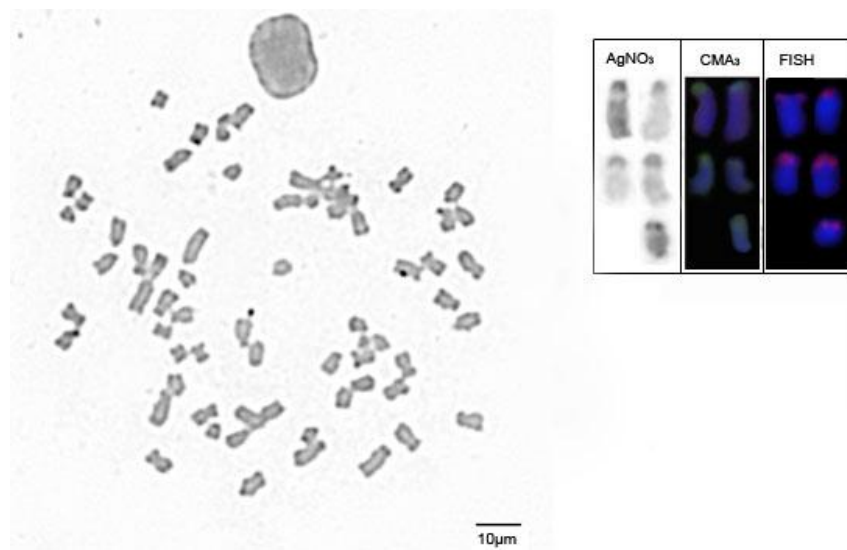


Figura - 12: Metáfase evidenciando o padrão de Heterocromatina em *H. commersonii*, em destaque, cromossomos portadores das RONS em diferentes tratamentos



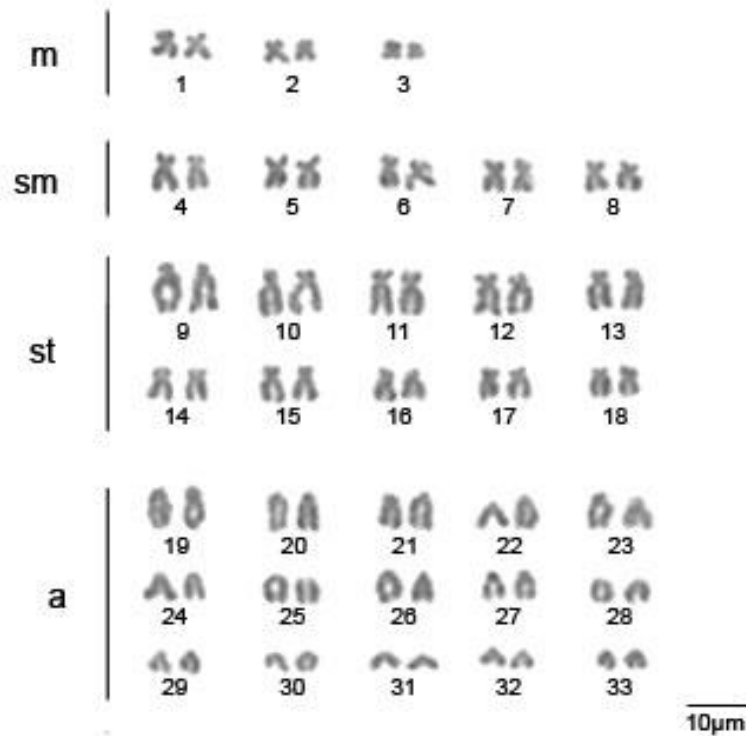


Figura - 13: Cariótipo de *H. derbyi*, coloração convencional Giemsa

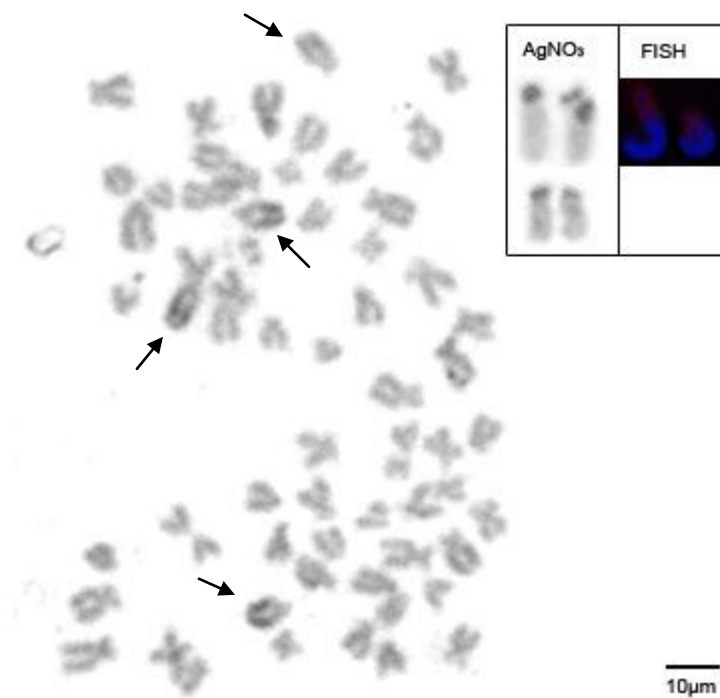


Figura - 14: Metáfase evidenciando o padrão de heterocromatina em *H. derbyi*, as setas indicam blocos heterocromáticos; em destaque, cromossomos portadores das RONS em diferentes tratamentos

## Discussão

O gênero *Hypostomus* apresenta grande variabilidade quanto ao número diplóide variando desde  $2n = 54$  em *Hypostomus plecostomus* (MURAMOTO *et al.*, 1968) a  $2n = 84$  em *Hypostomus* sp. 2 (KAVALCO *et al.*, 2005). Destaca-se que *H. emarginatus* foi recentemente realocada taxonomicamente fora do gênero *Hypostomus* como *Squaliforma emarginata* (MONTROYA-BURGOS *et al.*, 2002), e portanto, o número diplóide de  $2n = 52$  cromossomos (ARTONI e BERTOLLO, 2001) não é válido para descrever a extensão da variabilidade do número diplóide no gênero *Hypostomus*. Se considerarmos ainda que na década de 60, as técnicas da citogenética ainda não eram tão resolutivas e que os problemas de identificação taxonômica neste gênero não eram diferentes daquelas hoje relatados, seria mais prudente considerar com menor número diplóide a espécie que apresenta  $2n = 66$  *Hypostomus* sp. G (ARTONI *et al.*, 1998).

No presente trabalho foi constatada uma nova macroestrutura cariotípica para *Hypostomus* aff. *ancistroides* com número diplóide igual a 66 (12m, 16 sm, 10st e 28a). Para *Hypostomus commersonii* foi encontrado número diplóide igual a 68 (12m, 12sm, 8st e 36a), número este igual ao descrito para a espécie em Quedas do Iguaçu (CASALE *et al.*, 2002 apud KANTEK *et al.*, 2007) (Tab. 2), contudo com divergências em relação a fórmula cariotípica, principalmente em relação à quantidade de acrocêntricos. Já em *Hypostomus derbyi*, o número diplóide também encontrado por CASALE *et al.* (2002) não concorda com aquele descrito para esta espécie na região de Quedas do Iguaçu. Neste trabalho foi evidenciado um número diplóide menor que aquele já descrito anteriormente, com  $2n = 66$  (6m, 10sm, 20st e 30a) em oposição à  $2n = 68$  (10m, 8sm, 16st e 34a). É possível hipotetizar que, uma vez que eventos robertsonianos de fissão e/ ou fusão

cêntrica são representativos na evolução cariotípica neste gênero (ARTONI e BERTOLLO, 2001), efeitos de alopatria podem acumular diferenças cariotípicas entre populações de uma mesma espécie como se observa nas populações de *H. commersonii* e *H. derbyi* aqui analisadas.

O Bandamento C evidenciou para *H. commersonii* um padrão de distribuição de heterocromatina concordando com o padrão dos Siluriformes, apresentando pouca heterocromatina, presente principalmente nas regiões pericentroméricas e teloméricas (GOLD *et al.*, 1990). No entanto, as populações de *H. aff. ancistroides* e *H. derbyi* revelaram grandes blocos heterocromáticos embora nenhum destes blocos tenha sido evidenciado com a dupla coloração fluorescente, demonstrando a natureza heterogênea na composição destes blocos.

Múltiplas Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) são frequentemente encontradas neste gênero (ARTONI e BERTOLLO, 1996), embora RONs simples já tenham sido detectadas em alguns grupos (ARTONI e BERTOLLO, 2001). No presente trabalho todas as populações apresentaram RONs múltiplas. Quanto à posição, todas as RONs aqui encontradas estão situadas em regiões terminais, como observado na maioria dos Loricariidae e na maioria dos peixes neotropicais. Os sítios de RONs foram todos evidenciados pela CMA<sub>3</sub> indicando um arranjo destas regiões ricas em bases GC disponíveis à coloração por este fluorocromo. Esta correlação já foi observada em diversas espécies (DA SILVA CORTINHAS *et al.*, 2003; CIPRIANO, 2005; NOLETO *et al.*, 2006, entre outros). Contudo, há que se considerar que nem toda heterocromatina rica em CG pode estar associada com RONs, como verificado por ARTONI *et al.* (1996) no loricariideo *Liposarcus anisitsi*. que apresenta grandes blocos heterocromáticos não

portadores de RONS brilhantes com o fluorocromo CG específico mitramicina quando contra-corado com distamicina

A detecção dos sítios portadores de genes ribossomais através da hibridização *in situ* fluorescente corroborou as RONS encontradas tanto em *H. commersonii* quanto em *H. aff. ancistroides*. Contudo, apesar de ter sido encontrado RONS variando de 2 a 4, só foram identificados 2 sítios fluorescentes pela FISH com sondas 18S em *H. derbyi* (Tab. 2). Este fato pode evidenciar uma condição polimórfica que suscita intensificar um estudo populacional acerca da atividade gênica das regiões organizadoras de nucléolos pela impregnação com nitrato de Prata e da localização de genes DNAr 18S pela FISH.

Os dados cariotípicos aqui apresentados se revelaram de grande importância citotaxonômica para diferenciar as espécies entre si e destas com outras populações alopátricas com cariótipo já descritos (Tab. 2).

A diferença da quantidade de cromossomos que compõe o complemento, aliado às distintas características relacionadas ao padrão de heterocromatina, bem com a quantidade e localização dos sítios ribossomais, reforçam a proposta de que as populações aqui descritas, em relação àquelas anteriormente caracterizadas, não pertencem à mesma espécie. Podem ser consideradas então espécies crípticas, cuja morfológica impede sua correta classificação sem o auxílio de ferramentas como a citogenética.

	<i>H. commersonii</i>	<i>H. aff. ancistroides</i>	<i>H. derbyi</i>
2n	68	66	66
NF	100	104	96
Sist. Sexual	-	-	-
Heterocromatina	Pouca principalmente nas regiões pericentroméricas e teloméricas	Braços cromossômicos com grandes blocos heterocromáticos	
RONs	Múltiplas, até 5	Múltiplas, até 6	Múltiplas, até 4
CMA <sub>3</sub> /DAPI	RONs GC, 5 sítios	RONs GC, 6 sítios	-
FISH 18S	5 sítios	6 sítios	2 sítios
Descrição Anterior	68	-	68

Tabela 2 – Quadro comparativo entre as espécies *H. commersonii*, *H. aff. ancistroides* e *H. derbyi*.

### Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

### Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

## 5. Considerações finais

O gênero *Hypostomus* apesar de ser o mais estudado dentre os Loricariidae ainda apresenta uma grande lacuna em relação ao conhecimento acerca do cariótipo de suas espécies. Contudo, tendências evolutivas já foram e continuam a ser apontadas e os marcadores cromossômicos têm contribuído para um melhor entendimento da sistemática do grupo. Assim o presente trabalho traz a luz novos dados sobre o cariótipo de cinco espécies de *Hypostomus* e contribuí para ampliar o conhecimento do cariótipo tanto interespecífico quanto específico neste grupo de peixes neotropicais, podendo concluir que:

- a) As características da macroestrutura cariotípica ( $2n$ , NF e fórmula cariotípica) das espécies estudadas corroboram os dados da literatura, contribuindo para elucidar evolução cariotípica do gênero *Hypostomus* e fornecem subsídios para a citotaxonomia destas espécies e populações.
- b) As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONS) se mostraram variáveis quanto ao número e atividade dos sítios ribossomais. As RONS múltiplas foram as mais comuns entre as espécies estudadas, tanto pela marcação com nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) quanto pela confirmação com o emprego de sondas do DNAr 18S. Um caso especial em *H. derbyi* mostrou uma discordância com um número menor de genes de DNAr 18S evidenciados pela FISH em oposição à atividade de um maior número de RONS verificadas pela coloração com Prata. Este deve ser um caso de variação polimórfica que necessita de aumento no

número da amostra para melhor definir sobre a dinâmica das RONS nesta população;

- c) A localização cromossômica pelo emprego do Bandamento C possibilitou evidenciar marcações mais frequentes nas regiões teloméricas e pericentroméricas de cromossomos dos cariótipos. Contudo, algumas marcações intersticiais sobre o braço longo de alguns cromossomos subtelocêntricos e/ou acrocêntricos indicam uma distribuição equilocal e reforçam hipóteses já colocadas sobre a natureza e distribuição da heterocromatina neste gênero. As RONS sempre se apresentaram GC positivas, o que sugere uma forte associação destas regiões heterocromáticas com o DNAr;

A presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW em *H. albopunctatus* somada a outras divergências apontam para tendências evolutivas distintas mesmo entre espécies simpátricas de *Hypostomus*.

## 6. Referências Bibliográficas

- AFFONSO, P. R. A. M. **Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes)**. Dissertação (Mestrado: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2000
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. e TOLEDO-FILHO, S. A. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater. **Chromosome**, 13: 169-182, 2000.
- ALVES, A. L. **Análise e evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichtiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial**. Dissertação (Mestrado - Instituto de Biociências, Área de concentração em Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2000
- AMEMIYA, T. e GOLD, J. R. Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolus organizer regions of Fish chromosomes. **Copeia**, 1: 226-231, 1986
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 141:1-80, 2004
- ARTONI, R. F. e BERTOLLO, L. A. C. Regiões Organizadoras de Nucléolos e Heterocromatina constitutiva em peixes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). **Resumos**: IV Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais, p.36, 1992
- ARTONI, R. F. e BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in genus *Hypostomus*. **Caryologia**, 49: 81-90, 1996
- ARTONI, R. F. e BERTOLLO, L. A. C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, 106: 209-214, 1999
- ARTONI, R. F. e BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, 134: 201-210, 2001



ARTONI, R. F.; VENERE P. C. e BERTOLLO L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, 63: 421–425, 1998

ARTONI, R. F.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A. C. e GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genet. Mol. Biol.** Vol22 n.1 São Paulo, 1999

ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes Neotropicais: Métodos, resultados e perspectivas. **Publicatio UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 6: 43-60, 2000

BEÇAK, W. e BEÇAK, M. L. Cytotaxonomic and chromosomal evolution in Serpentes. **Cytogenetics (Basel)**, v. 08: 247-262, 1969

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S. e MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal Genetics**, 1: 103-120, 1978

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. e GALETTI Jr., P. M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. **J. Fish Biol.**, 28: 153-159, 1986

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**: 79-108. Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, SP, 1972

BRUM, M. J. I. Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. Soc. Bras. de Gen., **Série Monografias** 2: 5-42, 1995

CAMILO, F. M. e MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic description of *Corumbataia cuestae* (Pisces, Loricariidae, Hypoptopomatinae) **Cytologia**, 70: 47-51, 2005

CEREALI, S. S. **Estudos citogenéticos de Loricariidae (Siluriformes) do planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006

CIPRIANO, R. R. **Estudos Citogenéticos em Teleósteos marinhos pertencentes a Baía de Paranaguá- Paraná, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2005

DA SILVA CORTINHAS, M. C.; CESTARI, M. M.; SWARÇA, A. C. e FENOCCHIO, A. S. First chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the south coast of Brazil. Conventional, C-NOR and CMA<sub>3</sub> bandings and FISH studies. **Caryologia**, 56 (2): 187-191, 2003

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B. e ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of catfish genus *Ancistor* Kner 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, 5 (3): 301-307, 2007

DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. *In*: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS. p.278-330, 1998

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS, A. L. e BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia** 44: 161-166, 1991

FERNANDEZ, J. L.; GOYANES, V. J.; RAMIRO-DIAS J. e GOSALVEZ, J. Evidence of a differential organization of chromatin containing terminal or interstitial (TTAGGG)(n) repeats by *in situ* digestion with nucleases. **Cytogenet. Cell Genet.**, 82:195-198, 1998

FERRARIS Jr., C. J. Check list of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418: 1-628, 2007

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. e BRISCOE, D. A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, 2004

GARCIA, F.; NOGUES, C.; GARCIA, M.; EGOZCUE, J. e PONSÀ, M. Characterization of constitutive heterochromatin in *Cebus apella* (Cebidae, Primates) and *Pan troglodytes* (Hominidae, Primates): comparison to human chromosomes. **Am. J. Primatol.**, 49:205-221, 1999

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae).** Tese de doutorado. Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, SP, 1998

GOODPASTURE, C. e BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, 53: 37-50, 1975

GOLD, J. R.; LI, Y. C.; SHIPLEY, N. S. e POWERS, P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**, 37: 563-575, 1990

GOSLINE, W. A. Contributions to the classification of the Loricariid catfishes. **Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, 41: 79-134, 1947

GRADWELL, N. A photographic analysis of the air breathing behavior of the catfish *Plecostomus punctatus*. **Can. J. Zool.**, 49: 1089-1094, 1971

GRAHAM, J. B. Air-breathing fishes - evolution, diversity and adaptation. **Academic Press, San Diego**, xi + 299 pp, 1997

HATANAKA, T. e GALETTI Jr., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, 122: 239- 244, 2004

HOWELL, W. M. e BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36: 1014-1015, 1980

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E. e PARDUE, M. L. Distribution of the 18 + 28 ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, v.53: 25-36, 1975

KANTEK. D. L. Z; CIPRIANO, R. R.; ABILHOA, V.; ARTONI, R. F. e CESTARI, M. M. Cytotaxonomic an evolutionary considerations about karyotypic data fishes from the Iguaçu River Basin in South of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50 (5): 793-802, 2007

KAVALCO, K. F.; PAZZ, R.; BERTOLLO, L. A. C. e MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Hereditas**, 94:180-186, 2005

LEVAN, A.; FREDGA, K. e SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52: 201-220, 1964

MARGARIDO, P. V. e GALETTI Jr, P. M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genet. Mol. Biol.**, v.23 (3), 2000

MARIOTTO, S.; ARTONI, R. F. e MIYAZAWA, C. S. Occurrence of sex chromosomes of the type ZZ/ZW in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, 57(4): 327-331, 2004

MARIOTTO, S., CENOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, A. C. B. e MOREIRA-FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7 (4): 595-600, 2009

MARTINS, C. e GALETTI Jr., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v.7: 363-367, 1999

MATHEY, R. **Les chromosomes des Vertébrés**. Rouge, Lausanne, 1949

MONTOYA-BURGOS, J. I.; WEBER, C. e LE BAIL, P. Y. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial d-loop sequences. **Revue Suisse de Zoologie** 109(2): 369-382, 2002

MURAMOTO, J.; OHNO, S. e ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, 24: 59-66, 1968

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley and Sons Inc., p. 523, 1994

NOLETO, R. B.; VICARI, M. R.; CIPRIANO, R. R.; ARTONI, R. F. e CESTARI, M. M. Physical mapping of 5S e 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). **Genetica**, 130: 133-138, 2007

OLIVEIRA, C. e GOSZTONYI, A. E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriformes. **Caryologia**, vol.53 (1): 31-37, 2000

OLIVEIRA, C. **Estudos citogenéticos e conteúdo de ADN na família Callichthyidae (Pisces, Siluriformes)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, 155p, 1991

OHNO, S. **Evolution by gene duplication**. New York: Springer-Verlag, p.160, 1970

OZOUF-COSTAZ, C. e FORESTI, F. Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. *In: Proceedings of the 7th International Congress of Ichthyology. Netherlands Journal of Zoology*, 42 (2-3): 277-290, 1992

PINKEL, D.; STRAUME, T. e GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of National Academy of Sciences**, 83: 2934-2938, 1986

PROVENZANO, F.; SCHAEFER, S. A.; BASKIN, J. N. e ROYERO-LEON, R. New, possibly extinct Lithogenine loricariid (Siluriformes, Loricariidae) from Northern Venezuela. **Copeia**, 2003: 562–575, 2003

RAVEDUTTI, C. G. e JÚLIO Jr., H. F. Cytogenetic Analysis of three species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. **Cytologia**, 66: 65-70, 2001

REIS, R. E., WEBER, C. e MALABARBA, L. R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Rev. Suis. Zool.** 97(3): 729–766, 1990

REIS, R. E.; KULLANDER, S.O. e FERRARIS Jr, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South America**. Edipucrs, Porto Alegre, RS, 2003

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. Delturinae, a new loricariidae catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with a revision of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 147 (5): 277-299, 2006

SCAVONE, M. D. P. e JÚLIO Jr., H. F. Cytogenetics analysis and heterochromatin distribution in ZZ/ZW sex chromosomes of the mailed catfish *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae: Siluriformes). **Brazil. J. Genet.**, 1: 31-35, 1995

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluriformes: Loricariidae). Pp. 375-400. *In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Porto Alegre: EDIPUCRS.p.375-400, 1998

SCHAEFER, S. A. Relationships of *Lithogenes villosus* Eigenmann, 1909 (Siluriformes: Loricariidae): evidence from high-resolution computed microtomography. **Am. Mus. Novit.** 3401: 1–55, 2003

SCHWEIZER D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**. 58:307-324, 1976

SOLA, L.; BRESSANELLO, S.; ROSSI, A. R.; IASELLI, V.; CROSSETTI, D. e CATAUDELLA, S. A karyotype analyses of the genus *Dicentrarchus* by different staining techniques. **Journal of Fish Biology**, 43: 329-337, 1993

SOUZA, I. L; MOREIRA-FILHO, O. e GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazil. J. Genet.** 19(3): 405-410, 1996

STOLF, R.; SWARÇA, A. C.; GIULIANO-CAETANO, L. e DIAS, A. L. Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the basin of the Tibagi river, Paraná, Brazil. **Caryologia**, v. 57 (4):348-352, 2004

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.**, 75:304-306, 1972

VARI, R. P. e MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: Overview. *In*: **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes** ( eds. Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S. e Lucena, C. A. S.), Edpurcs, Porto Alegre – Brasil, pp. 1-11, 1998

WEBER, C.. Subfamily Hypostominae, *In* **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, edited by R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris Jr. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 351–372, 2003

ZAWADZKI, C. H.; RENESTO, E.; REIS, R. E; MOURA, M. O. e MATEUS, R. P. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) for the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetica**, 123: 271-283, 2005